



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ: ΡΟΛΟΣ miRNA**

**ΣΟΦΙΑ ΜΠΟΥΚΟΥΡΑ**  
**ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**ΛΑΡΙΣΑ**  
**Σεπτέμβριος 2015**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Νικόλαος Βαμβακόπουλος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής

Μαρία Σάτρα, ΕΔΙΠ

Αλέξανδρος Δαπόντε, Αναπληρωτής Καθηγητής

# **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
1.1 Γενικά .....	7
1.2 Πώς ανακαλύφθηκαν τα miRNAs .....	7
1.3 Ονοματολογία .....	10
1.4 Η Βιογένεση .....	11
1.5 Η Λειτουργία .....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ. ΚΑΡΚΙΝΟΣ .....	14
2.1 miRNAs και καρκίνος .....	15
2.2 Μηχανισμοί απορύθμισης των miRNAs στο καρκίνο .....	18
2.3 Μονοπάτια που επηρεάζονται.....	19
2.4 Τα miRNAs ως εργαλεία πρόγνωσης.....	21
2.5 Τα miRNAs ως θεραπευτικά μόρια έναντι του καρκίνου .....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ. ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΙ.....	27
3.1. Καρκίνος των ωοθηκών .....	28
3.2 Καρκίνος της μήτρας – ενδομητρίου.....	30
3.3 Καρκίνος του τραχήλου.....	32
3.4 Καρκίνος του κόλπου .....	33
3.5. Καρκίνος του αιδοίου .....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙV. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ microRNAs ΣΕ ΟΡΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥΣ .....	35
4. Καρκίνος των ωοθηκών.....	36
4.1 Εισαγωγή στο καρκίνο των ωοθηκών .....	36
4.2 Τα miRNAs ως διαγνωστικά εργαλεία για το καρκίνο των ωοθηκών .....	38
4.3 Η έκφραση των miRNAs στο καρκίνο των ωοθηκών.....	42
4.4. Ο ρόλος των microRNAs στη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών .....	46
5. Καρκίνος μήτρας – ενδομητρίου.....	48
5.1 Τα miRNAs στο ενδομήτριο .....	48
5.2 Καρκίνος του ενδομητρίου και miRNAs.....	49
5.3 Τα miRNAs στο καρκίνο της μήτρας .....	51
5.4. Ο ρόλος των microRNAs στη θεραπεία του καρκίνου της μήτρας .....	56
6. Καρκίνος του αιδοίου .....	58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ microRNAs ΣΕ ΟΡΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΜΗ	
ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥΣ (ΑΠΟ ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ) .....	61
7. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας.....	62
7.1 Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας από τον ιό HPV .....	63
7.2 P53 και miRNAs .....	65
7.3 Αλλαγές των miRNAs στο καρκίνο του τραχήλου της μήτρας .....	65
7.4. Ο ρόλος των microRNAs στη θεραπεία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας	
.....	70
7.5 Η παρουσία των miRNAs και η θεραπευτική αντίσταση στο καρκίνο του	
τραχήλου της μήτρας .....	71
7.6 Ραδιο-αντίσταση στο καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ελεγχόμενη από τα	
miRNAs .....	72
8. Καρκίνος του κόλπου .....	75
8.1 HPV16 και HPV18 μόλυνση, ρυθμίζει την έκφραση ενός υποσυνόλου των	
miRNAs υποδοχέων .....	77
8.2 Τα miRNAs ρυθμίζουν το HPV18 κατά τη διάρκεια της παραγωγικής μόλυνσης	
.....	78
8.3 Θεραπεία του καρκίνου του κόλπου.....	80
8.4 Κλασικές θεραπείες και φάρμακα .....	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86

# Ευχαριστίες

Η συγγραφή μιας διπλωματικής εργασίας σημαίνει το τέλος μίας δύσκολης αλλά συνάμα εποικοδομητικής περιόδου μέσα στην οποία πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η παρακολούθηση των μεταπτυχιακών σπουδών. Πρόκειται για μία επίπονη διανοητική εργασία, η οποία για να φτάσει στο πέρας της είναι απαραίτητη η συνδρομή κάποιων ανθρώπων που παρέχουν είτε ψυχολογική υποκίνηση, είτε συνδράμουν με τις γνώσεις και το ερευνητικό τους έργο.

Οι αρχικές μου ευχαριστίες απευθύνονται στο κύριο Αλέξανδρο Ι. Δαπόντε Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Διευθυντής του Π.Μ.Σ. «Βιολογία της Αναπαραγωγής» καθώς και μέλος της τριμελούς επιτροπής για την αξιολόγηση της Διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Νικόλαο Βαμβακόπουλο , Καθηγητή Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που μου εμπιστεύτηκε την έρευνα αυτού του θέματος της διπλωματικής εργασίας, επιτρέποντάς μου μ' αυτόν τον τρόπο να εξοικειωθώ με τις νέες μελέτες και να εμπλουτιστεί το γνωστικό μου πεδίο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στη σύμβουλο της Διπλωματικής μου εργασίας κυρία Μαρία Σάτρα , Ε.ΔΙ.Π Εργαστήριο Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αφού χωρίς την αμέριστη και απλόχερη βοήθειά της, η ολοκλήρωση της μελέτης θα ήταν αδύνατη. Το αμείωτο ενδιαφέρον της, οι υποδείξεις, η καθοδήγηση, η προθυμία της και η συμπαράστασή της κατά τη συγγραφή της εργασίας, ήταν καθοριστική.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιολογία της Αναπαραγωγής» , που με την πολυετή πείρα τους κατόρθωσαν να μεταδώσουν με επιτυχία τις εξελίξεις στην επιστήμη τους και να θωρακίσουν με πολύτιμες γνώσεις την περαιτέρω επαγγελματική μου σταδιοδρομία.

Ευχαριστώ θερμά ολόκληρο το ανθρώπινο δυναμικό του Μεταπτυχιακού προγράμματος, για τις γνώσεις , τις εμπειρίες και τα βιώματα, που με ζήλο, όρεξη και υπομονή , τις περισσότερες φορές , μετέδωσαν σε μένα και στις συμφοιτήτριες μου.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλες τις συμφοιτήτριες μου, για τη βοήθεια και την αλληλοϋποστήριξη στο πλαίσιο των σπουδών καθώς , χωρίς τη συνεργασία και την ανταλλαγή ιδεών και εμπειριών, θα ήταν δύσκολη η περάτωση της χρονιάς. Ελπίζω να ανταπέδωσα και να συνεχίσω να ανταποδίδω τη βοήθεια που μού προσέφεραν.

Πάνω απ' όλα, είμαι ευγνώμων στους γονείς μου και την οικογένεια μου, για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια, που ενθαρρύνουν και στηρίζουν έμπρακτα κάθε μου προσπάθεια.

# **I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΓΕΝΙΚΑ

**Η** ροή της πληροφορίας μέσα στο κύτταρο έχει την εξής κατεύθυνση: από το DNA, περνά στο RNA και από εκεί στις πρωτεΐνες. Με άλλα λόγια, τα γονίδια τα οποία είναι κομμάτια DNA, περιέχουν την πληροφορία για τη δημιουργία των πρωτεϊνών την οποία μεταβιβάζουν μέσω του RNA (και ειδικότερα στο mRNA). Η αρχική διατύπωση του δόγματος, το οποίο περιγραφικά συνοψίζεται  $\text{DNA} \rightarrow \text{RNA} \rightarrow \text{πρωτεΐνη}$ , υπέστη μια αρχική τροποποίηση όταν ανακαλύφθηκαν οι RNA-ιοί. Το γενετικό υλικό των ιών αυτών δεν είναι το DNA, όπως συμβαίνει με την πλειονότητα των οργανισμών, αλλά το RNA. Τώρα το δόγμα θα πρέπει να υποστεί και δεύτερη τροποποίηση: μεταξύ των κομματιών που DNA τα οποία μελέτησαν οι ερευνητές κατά την τελευταία δεκαετία διαπιστώθηκε ότι πολλά κομμάτια DNA δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά RNA. Η πληροφορία δηλαδή η οποία εμπεριέχεται σε αυτά τα κομμάτια DNA δεν χρησιμοποιείται για τη δημιουργία πρωτεϊνών αλλά για τη δημιουργία μορίων RNA τα οποία ονομάστηκαν microRNAs ή miRNAs

Τα MicroRNAs (miRNAs) ανήκουν σε μια καινούργια τάξη μικρών, μονόκλωνων μορίων RNA, με μόλις 22 νουκλεοτίδια μήκος, κατά μέσο όρο, τα οποία δεν κωδικοποιούν πεπτίδια. Λειτουργικός τους ρόλος είναι ο υβριδισμός με αγγελιοφόρα RNA (mRNA), σε ένα μοτίβο μερικής ή πλήρους συμπληρωματικότητας που οδηγεί σε παρεμπόδιση της μετάφρασης ή ενδονουκλεοτιδική διάσπαση. Η παρουσία τους σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς και η ρύθμιση που επιτελούν στη γονιδιακή έκφραση κατά το μετα-μεταγραφικό επίπεδο, τα καθιστούν ως ένα πολύ δημοφιλές αντικείμενο μελέτης στη Βιολογία (1)

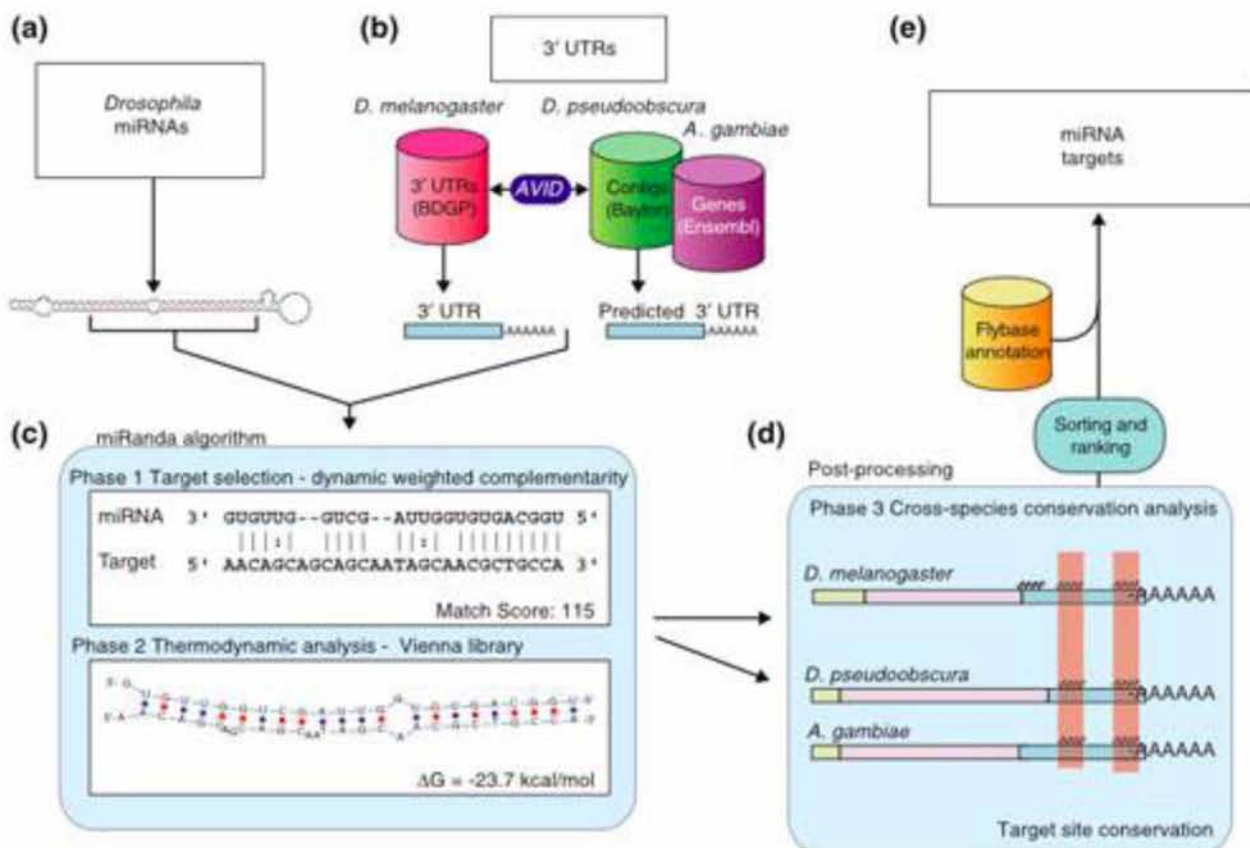
## 1.2 Πως ανακαλύφθηκαν τα miRNAs

Το πρώτο miRNA ανακαλύφθηκε το 1993 από τον Victor Ambros, Rosalind Lee και Rhonda Feinbaum κατά τη διάρκεια μιας μελέτης του γονιδίου lin-4, το οποίο είναι γνωστό ότι ελέγχει το χρονοδιάγραμμα των *C. elegans* για την ανάπτυξη των προνυμφών, με την καταστολή του γονιδίου lin-14. Όταν απομονωθεί το γονίδιο lin-4, βρήκαν ότι αντί να παράγει ένα mRNA που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, παρήγαγε μη

κωδικοποιητικό μικρό RNAs, ένα από τα οποία ήταν ένα RNA ~ 22-νουκλεοτιδίων που περιείχε αλληλουχίες μερικώς συμπληρωματικές σε πολλαπλές αλληλουχίες στο 3' UTR των *lin-14* mRNA. Το ένα από τα δύο RNA που μεταγράφονται από το *lin-4* έχει μέγεθος 22 και το άλλο ~60 νουκλεοτίδια. Το μεγαλύτερο RNA είχε προταθεί ότι έχει δευτεροταγή δομή που μοιάζει με φουρκέτα και ότι είναι το πρόδρομο μόριο του μικρότερου. Αργότερα, βρέθηκε ότι στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA του γονιδίου *lin-14* υπήρχαν περιοχές με συμπληρωματικότητα στο μικρότερο RNA. Αυτή η παρατήρηση απέκτησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον όταν συνδυαζόταν με το γεγονός ότι μεταλλάξεις στην ίδια περιοχή επηρέαζαν την μετάφραση του *lin-14* RNA. Η περιοχή αυτή είχε συνδυαστεί ήδη με τη ρύθμιση του *lin-14* από *lin-4*, το οποίο επηρέαζε σημαντικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης LIN-14, χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα του mRNA. Αργότερα ανακαλύφθηκε και άλλο ένα παρόμοιο γονίδιο το *let-7* το οποίο είχε σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καινοραβδίτη και λειτουργούσε με τον ίδιο τρόπο σαν το *lin-4*.

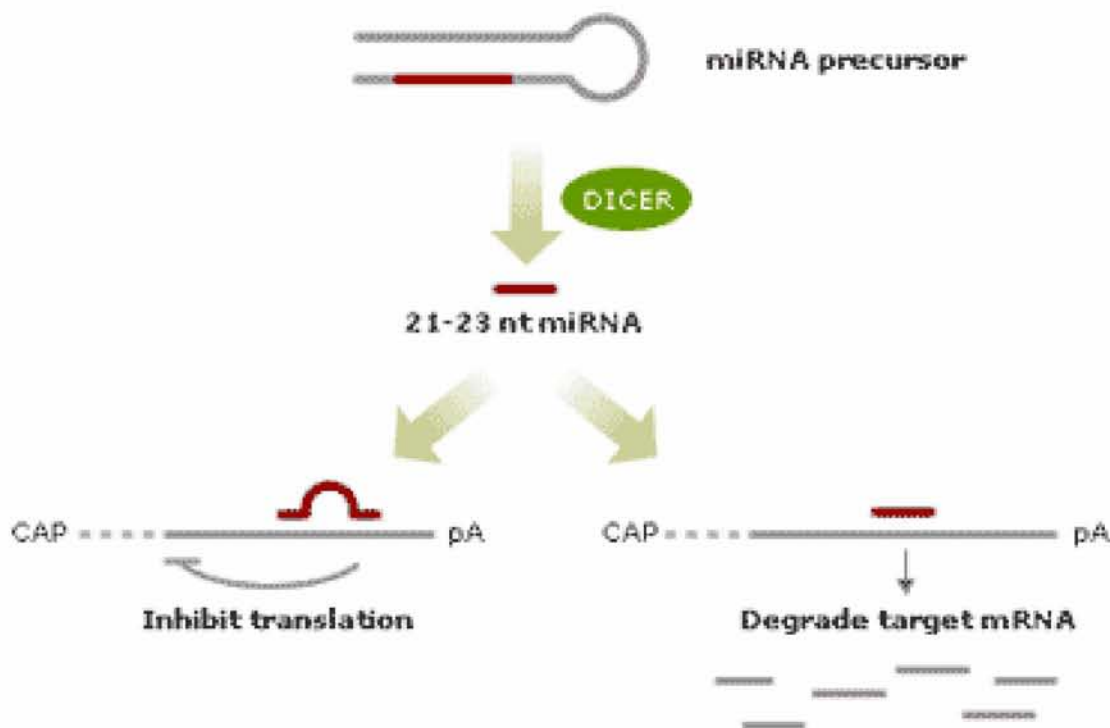
Αυτά τα μικρού μεγέθους μόρια RNA επειδή ορίζανε τα χρονικά όρια των αναπτυξιακών σταδίων την προνύμφης του καινοραβδίτη ονομάστηκαν «μικρά χρονικά RNA» (small temporal RNA, stRNA). Τα stRNA επειδή είχαν αυστηρά καθορισμένη λειτουργία θεωρήθηκε ότι ήταν μία κατηγορία γονιδίων χαρακτηριστική για τον καινοραβδίτη. Την εποχή που διαφάνηκε η άμεση σχέση των siRNA με τη PTGS/RNAi και ο σημαντικός τους ρόλος στην ρύθμιση των γονιδίων σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο, τρεις διαφορετικές ερευνητικές ομάδες ανέπτυξαν τεχνικές χαρακτηρισμού και αλληλούχισης μικρομοριακών RNA, με σκοπό να ανακαλύψουν ενδογενή siRNA. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε διάφορα μικρού μεγέθους μονόκλωνα μόρια RNA με δομική ομοιότητα με τα *lin-4* και *let-7*. Τα μόρια αυτά ανακαλύφθηκαν αρχικά στην *Δροσόφιλα* (Εικόνα 1) και στο καινοραβδίτη σήμερα ομόλογα γονίδια έχουν βρεθεί επιπλέον στα θηλαστικά και στα φυτά και είναι γνωστά σαν «μικρά RNA» (micro RNA, miRNA). (2)





Εικόνα 1: microRNA διαδικασία ανίχνευσης στόχων για το *D. Melanogaster*

Τα miRNA συνδέονται με τα mRNA. Η σύνδεση δεν είναι τυχαία: απαιτείται συμπληρωματικότητα των βάσεων για να επιτευχθεί. Καθώς όμως το mRNA οφείλει να είναι μονόκλωνο προκειμένου να αξιοποιηθεί η πληροφορία που κουβαλά, η σύνδεσή του το συμπληρωματικό miRNA (και η δημιουργία δίκλωνου μορίου) έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της ροής της πληροφορίας. Με άλλα λόγια, όταν ένα mRNA συνδέεται με το συμπληρωματικό miRNA του, η σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης σταματά. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2: Αναστολή της μετάφρασης και αποικοδόμηση στόχων mRNA.

### 1.3 Ονοματολογία

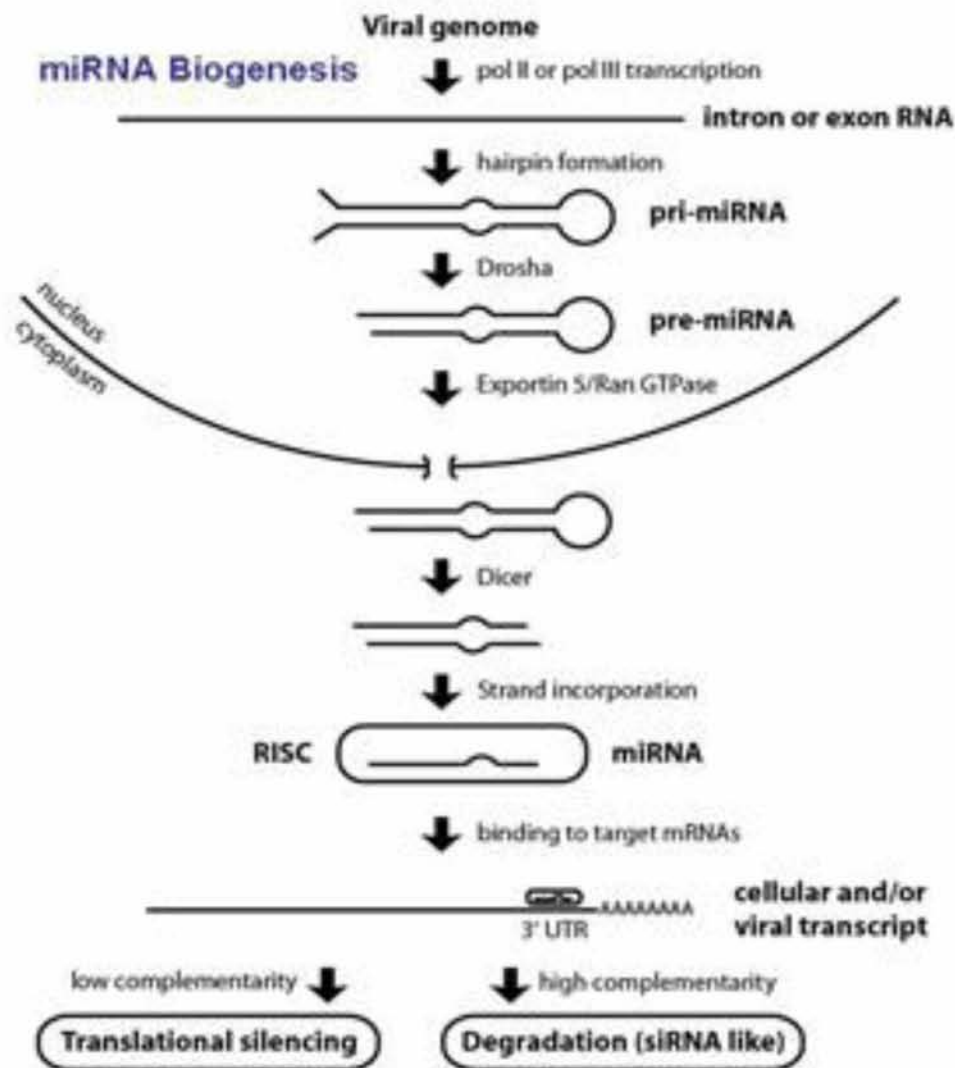
Σύμφωνα με ένα πρότυπο σύστημα ονοματολογίας, τα ονόματα ανατεθεί επιβεβαιώθηκε πειραματικά miRNAs πριν από τη δημοσίευση της ανακάλυψής τους. Το πρόθεμα "miR" ακολουθείται από μια παύλα και έναν αριθμό, ο τελευταίος συχνά ενδεικτικός της τάξης του ονομασία. Για παράδειγμα, το miR-124 ανακαλύφθηκε πιθανό πριν από το miR-456. Ένα κεφαλαιοποιημένο "MIK" αναφέρεται στην ώριμη μορφή του miRNA, ενώ ο χωρίς κεφαλαία "MIK" αναφέρεται στο προ-miRNA και το pri-miRNA, και "MIR" αναφέρεται στο γονίδιο που τα κωδικοποιεί. Τα miRNAs έχουν σχεδόν πανομοιότυπες αλληλουχίες εκτός από ένα ή δύο νουκλεοτίδια που επισημειώνονται με ένα πρόσθετο γράμμα. Για παράδειγμα, το miR-124a είναι στενά συνδεδεμένο με το miR-124b. Προ-miRNAs, PRI-miRNAs και τα γονίδια που οδηγούν σε 100% ταυτόσημα ώριμα miRNAs, αλλά που βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία στο γονιδίωμα υποδεικνύονται με μια επιπλέον παύλα-αριθμός κατάληξη. Για παράδειγμα, το pro-miRNAs HSA-mir-194-1 και HSA-mir-194-2 οδηγούν σε ένα πανομοιότυπο ώριμο miRNA (HSA-miR-194), αλλά είναι από τα γονίδια που βρίσκονται σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος. Το είδος καταγωγής προσδιορίζεται με τρία γράμματα με πρόθεμα, π.χ., HSA-miR-124 είναι ένα ανθρώπινο (*Homo sapiens*) miRNA.

Άλλα κοινά προθέματα περιλαμβάνουν το «V» για ιογενή (miRNA που

κωδικοποιείται από το γονιδίωμα του ιού) και «d» για *Drosophila* miRNA . Όταν δύο ώριμα microRNAs προέρχονται από απέναντι βραχίονες του ίδιου pro-miRNA και βρίσκονται σε περίπου παρόμοια ποσά, σημειώνονται με -3p ή -5p κατάληξη. Ωστόσο, τα ώριμα microRNA που βρέθηκαν από ένα βραχίονα της φουρκέτας είναι συνήθως πολύ πιο άφθονα από αυτό που διαπιστώθηκε από το άλλο σκέλος, στην οποία περίπτωση, ένας αστερίσκος μετά το όνομα δείχνει τα ώριμα είδη που βρέθηκαν σε χαμηλά επίπεδα από το αντίθετο βραχίονα μιας φουρκέτας. Για παράδειγμα, τα miR-124 και miR-124 \* μοιράζονται μια φουρκέτα προ-miRNA, αλλά πολύ περισσότερο το miR-124 βρίσκεται στο κύτταρο.

## 1.4 Η Βιογένεση

Τα γονίδια των miRNA κωδικοποιούν ένα πρόδρομο μετάγραφο miRNA το οποίο τροποποιείται για να παραχθεί τελικά το miRNA. Συνεπώς ακολουθούν διάφορα στάδια ωρίμανσης του αρχικού μεταγράφου μέχρι να παραχθεί το ώριμο miRNA. Το αρχικό ή πρώιμο μετάγραφο ονομάζεται pri-miRNA και μπορεί να είναι μονοκιστρονικό ή πολυκιστρονικό ανάλογα από την οργάνωση των γονιδίων από την οποία θα προκύψει. Το πρώτο από τα στάδια της ωρίμανσης γίνεται στον πυρήνα όπου από το pri-miRNA απομακρύνονται οι επιπλέον αλληλουχίες που μπορεί να φέρει από τη διαδικασία της μεταγραφής και μετατρέπεται σε πρόδρομο miRNA (pre-miRNA). Στην περίπτωση που το μετάγραφο είναι πολυκιστρονικό διαχωρίζονται ένα-ένα τα pre-miRNA. Ένα pre-miRNA έχει μέγεθος περίπου 60-80 νουκλεοτίδων και διατηρεί την δομή της φουρκέτας. Στη συνέχεια το pre-miRNA εξέρχεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα για το τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης του που είναι η αποκοπή του miRNA (Εικόνα 3 ). (2)



Εικόνα 3: miRNA Βιογένεση

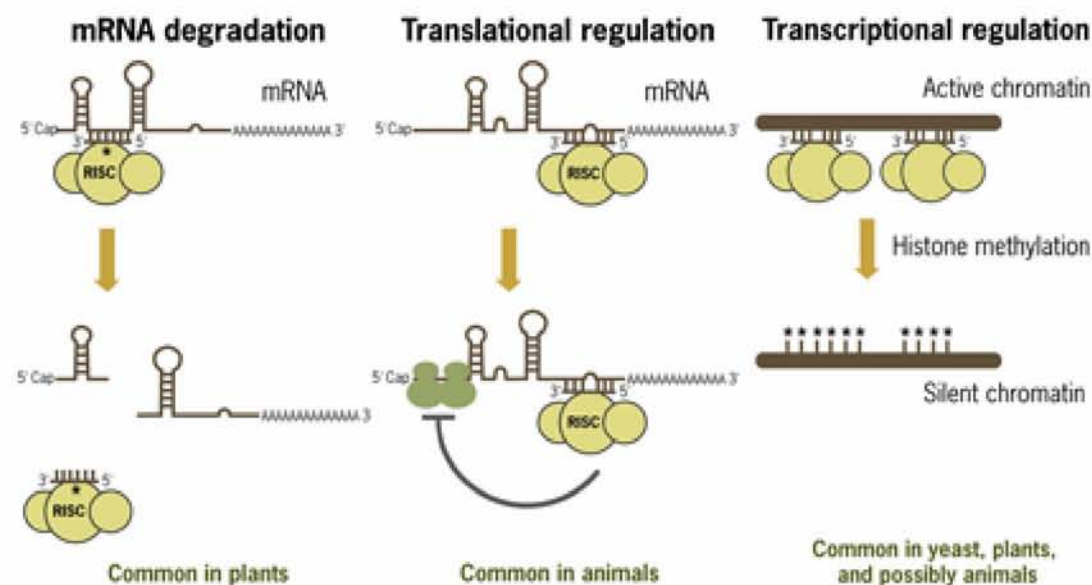
## 1.5 Η Λειτουργία

Από την εποχή που ξεκίνησε ο χαρακτηρισμός της λειτουργίας των miRNA φάνηκε ότι συμμετέχουν στα περισσότερα βιοχημικά και αναπτυξιακά μονοπάτια. Γενετικές μεταλλάξεις που δεν μπορούσαν να συσχετισθούν με την λειτουργία κάποιας πρωτεΐνης συχνά αποδεικνύονταν ότι οφείλονταν σε ένα γονίδιο miRNA. Πως όμως λειτουργούν τα miRNA; Τα stRNA όπως έχει ήδη αναφερθεί αποτελούν τα πρότυπα μέλη των miRNA, για την δομή τους αλλά και για την λειτουργία τους. Τα lin-4 και let-7 έχουν προταθεί ότι ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο ελέγχοντας την μετάφραση των μεταγράφων συγκεκριμένων γονιδίων στόχων. Είχε προταθεί ότι τα stRNA ελέγχουν τη μετάφραση ορισμένων mRNA μέσω πρόσδεσης τους σε συγκεκριμένες θέσεις στη 3' UTR. Η αρχική αυτή υπόθεση έχει αποδειχθεί για τα περισσότερα miRNA. Ο Lai πρώτος παρατήρησε ότι περιοχές στην 3'UTR ορισμένων γονιδίων στην Δροσόφιλα παρουσίαζαν μερική



ομολογία με κάποια miRNA. Συγκεκριμένα παρατήρησε ότι, τα έξι πρώτα νουκλεοτίδια στη 5' περιοχή ορισμένων miRNA ήταν πλήρως συμπληρωματικά με γνωστά μοτίβα τα οποία εντοπίζονται στην 3' UTR ορισμένων mRNA, και εμπλέκονταν με την μετάφραση των τελευταίων. Εκτός από τα 5-6 νουκλεοτίδια την 5' περιοχής των miRNA τα υπόλοιπα προσδένονται με μερική συμπληρωματικότητα. Αυτή η παρατήρηση έθεσε τον κανόνα της λειτουργίας των miRNA και ισχύει για τα περισσότερα miRNA που έχουν χαρακτηριστεί κυρίως στους ζωικούς οργανισμούς. Συνοπτικά φαίνεται ότι τα miRNA ελέγχουν την μετάφραση ενός mRNA μέσω της πρόσδεσης τους στην 3' UTR. Η πρόσδεση αυτή γίνεται με μερική συμπληρωματικότητα σε συγκεκριμένες αλληλουχίες παρεμποδίζοντας την μετάφραση τους. Το συμπέρασμα ότι ελέγχουν την μετάφραση προκύπτει από το γεγονός ότι ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης μειώνονται, η ποσότητα του mRNA παραμένει σταθερή. Ένα μεγάλο μέρος της έρευνας για την λειτουργία των miRNA έχει αναλωθεί στην ανάπτυξη υπολογιστικών και πειραματικών μεθόδων με σκοπό να χαρακτηριστούν ποια γονίδια ελέγχονται από τα miRNA. Η ανάπτυξη αλγορίθμων που ανιχνεύουν τις 3' περιοχές των γονιδίων ολόκληρων γονιδιωμάτων οδήγησαν στην δημιουργία λιστών γονιδίων που πιθανότατα ελέγχονται από ένα miRNA. Κάποια από τα ζευγάρια miRNA έχουν επιβεβαιωθεί και πειραματικά (2).

Όλα δείχνουν πως για το κύτταρο, τα miRNA είναι μόρια κλειδιά στη ρύθμιση της παραγωγής πρωτεϊνών. Για τους επιστήμονες όμως είναι και ένα καλό εργαλείο μελέτης και επέμβασης στα βιολογικά συστήματα με στόχο την κατανόησή τους αλλά και την αντιμετώπιση των ασθενειών.



Εικόνα 4: λειτουργίες των miRNA .

## **II. ΚΑΡΚΙΝΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ II. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

### 2.1 miRNAs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Τα miRNAs είναι πολύ σημαντικά τόσο για την ανάπτυξη των βλαστοκυττάρων, όσο και για την παθογένεση του καρκίνου. Έτσι, εντατικές έρευνες που λαμβάνουν χώρα τα τελευταία χρόνια αφορούν στο ρυθμιστικό ρόλο τους στην αυτο-ανανέωση, στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων. Τα miRNAs δρουν τόσο ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, όσο και ως ογκογονίδια. Συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης miRNAs έχουν περιγραφεί σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Παρά το γεγονός ότι δεν είναι απολύτως σαφές αν η απορρυθμισμένη έκφραση των miRNAs είναι μια αιτία ή ένα αποτέλεσμα της καρκινικής κατάστασης, η σημασία των ρυθμιστικών αυτών μορίων στον καρκίνο είναι πλέον εμφανής.

Η πρώτη ένδειξη για εμπλοκή των miRNAs στον καρκίνο του ανθρώπου περιγράφεται στις μελέτες των Calin et al. Κατά την αναζήτηση κάποιου ογκοκατασταλτικού γονιδίου στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (chronic lymphocytic leukemia, CLL) σε μια έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 13q14, βρέθηκε ότι η μικρή περιοχή της έλλειψης κωδικοποιεί δύο miRNAs, το miR-15a και το miR-16-1. Ανάλυση της έκφρασής τους σε δείγματα CLL και φυσιολογικά CD5+ λεμφοκύτταρα αποκάλυψε ότι η υποέκφραση των δύο miRNAs που μοιράζονται ένα πρόδρομο μετάγραφο συνδυάζεται διαρκώς με την έλλειψη στην περιοχή 13q14. Αυτό υποδεικνύει τον ογκοκατασταλτικό ρόλο των miR-15a και miR-16-1. Μεταγενέστερες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την εμπλοκή των miRNAs στην παθολογία του καρκίνου του ανθρώπου.

Για τα miRNAs που δρουν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, η ελαττωμένη έκφρασή τους στα καρκινικά βλαστοκύτταρα οδηγεί σε ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αυτά τα miRNAs φυσιολογικά ρυθμίζουν την απόπτωση, τη διαφοροποίηση και την αυτο-ανανέωση. Ένα παράδειγμα τέτοιων μορίων είναι η οικογένεια miRNA-34 (miR-34), που αποτελείται από τα miR-34-a, b και c, με υποέκφραση σε πολλούς καρκίνους. Αποκατάσταση της έκφρασης των miRNAs αυτής της οικογένειας σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου ή παγκρέατος που έχουν απαλοιφή του p53 οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση και σε απόπτωση. Τα εν λόγω αποτελέσματα δείχνουν την πιθανή σχέση του miRNA-34 με τη λειτουργία του p53. Πράγματι, σε κυτταρικές σειρές και ιστούς ποντικού, το p53

ρυθμίζει την έκφραση και των τριών miRNAs της οικογένειας miRNA-34 και αυτό οδηγεί σε αναστολή της έκφρασης μιας ομάδας γονιδίων-στόχων που φυσιολογικά υποστηρίζουν την ανάπτυξη του όγκου μέσω αναστολής της απόπτωσης, της προόδου του κυτταρικού κύκλου, της αναστολής της κυτταρικής γήρανσης και της προώθησης της μετανάστευσης κυττάρων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι φυσιολογικά το p53 επάγει την είσοδο του κυττάρου σε κατάσταση ηρεμίας μέσω της ενεργοποίησης του γονιδίου-αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, p21. Παρ' όλα αυτά, το miR-34 μπορεί να επάγει παύση του κύκλου στην G1 φάση ανεξάρτητα από το p21 σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους. Λόγω της ρύθμισης και της λειτουργίας τους, τα μέλη της οικογένειας miR-34 έχουν πιθανόν μια σημαντική επίδραση στην ογκοκατασταλτική λειτουργία του p53. Λόγω του γεγονότος ότι το p53 βρίσκεται μεταλλαγμένο σε ποσοστό >50% των καρκίνων του ανθρώπου, τα miRNAs της οικογένειας miR-34 συχνά υποεκφράζονται στους όγκους. Ωστόσο, ανεξάρτητα από αυτό το γεγονός, η αφθονία τους μπορεί επίσης να επηρεαστεί στο επίπεδο του γονιδιώματος. Στα γονιδιώματα σπονδυλοζώων, ένας γενετικός τύπος κωδικοποιεί το miR-34a και ένας δεύτερος τα miR-34b και miR-34c. Ακόμη και μεταξύ των πιο συγγενικών ειδών υπάρχει χαμηλή συντηρητικότητα των συγκεκριμένων γονιδίων, με εξαίρεση τις περιοχές που κωδικοποιούν τα miRNAs και τις πλησιέστερες στον υποκινητή μικρού μήκους περιοχές, αυτές δηλαδή όπου προσδένεται το p53. Το γονίδιο του miR-34a χάνεται στο νευροβλάστωμα και στους όγκους του παγκρέατος. Παρόμοια, απορρυθμισμένη έκφραση των miR-34b και miR-34c έχει παρατηρηθεί σε ένα υποσύνολο περιπτώσεων μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.

Το miR-34a στοχεύει το mRNA ενός πολύ σημαντικού μεταγραφικού παράγοντα, του E2F3, ο οποίος προσδένεται ειδικά στην πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, pRb. Αυτή η πρόσδεση εξαρτάται από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου και προκαλεί την παραγωγή πρωτεϊνών που διαδραματίζουν ρόλο στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση του DNA και στην αντιγραφή. Μείωση των επιπέδων του E2F3 με τεχνητή αύξηση των επιπέδων του miR-34 σε πρωτογενή νευροβλαστώματα παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ενεργοποιεί τα μονοπάτια του κυτταρικού θανάτου. Όλα αυτά τα πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο που κατέχει το miR-34 ως ογκοκατασταλτικό μόριο.

Η οικογένεια miR-34 αναστέλλει επίσης την έκφραση των γονιδίων notch, hmga2, cdk4, cdk6, cyclin E και bcl-2, τα οποία εμπλέκονται στην αυτο-ανανέωση και την επιβίωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων αφού επιδρούν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση και στην επιδιόρθωση του DNA. Το bcl-2 βρίσκεται



υπερέκφρασμένο στην πλειονότητα των καρκίνων του ανθρώπου και αυτή η υπερέκφρασή του συσχετίζεται με ανθεκτικότητα των καρκινικών βλαστοκυττάρων στη χημειοθεραπεία και στην ακτινοβολία. Το bcl-2προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες μέσω παρεμπόδισης της απόπτωσης. Η αποκατάσταση των επιπέδων των miR-34 σε καρκίνους του παγκρέατος και του γαστρεντερικού σωλήνα καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα στη χημειοθεραπεία, αναχαιτίζει την ανάπτυξη του όγκου και εμποδίζει το σχηματισμό ογκοσφαιρίων. Παρ' όλα αυτά, η λειτουργία της καταστολής του όγκου μέσω της τεχνητής αύξησης των επιπέδων των miR-34 φαίνεται να εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο. Έτσι, ενώ η αποκατάσταση της έκφρασης των miR-34 έχει οδηγήσει σε παύση του κυτταρικού κύκλου ή σε γήρανση σε ορισμένες μελέτες, σε άλλες έχει προκαλέσει απόπτωση. Επίσης, μειωμένη απόπτωση έχει παρατηρηθεί με εξάλειψη ή αναστολή των miR-34. Συνεπώς, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για την πλήρη κατανόηση της επίδρασης των miRNAs της οικογένειας miR-34 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους λόγω της τεράστιας πολυπλοκότητας των μονοπατιών που στοχεύονται. Η απορρύθμιση των miRNAs μπορεί να λειτουργήσει και προς την αντίθετη κατεύθυνση στον καρκίνο.

Η οικογένεια miR-17-92 είναι η πιο καλά μελετημένη σε αυτή την κατηγορία. Η οικογένεια περιλαμβάνει 14 ομόλογα miRNAs που κωδικοποιούνται από τρεις ομάδες γονιδίων στα χρωμοσώματα 7, 13 και X. Η ομάδα στο χρωμόσωμα 13 εμφανίζεται σε περισσότερα του ενός αντιγράφου στα λεμφώματα των B-κυττάρων του ανθρώπου, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη έκφραση πολλών miRNAs. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η υπερέκφραση της ομάδας miR-17-92 συνδυάζεται με το myc για επιτάχυνση της ανάπτυξης του όγκου σε ένα μοντέλο λεμφώματος των B-κυττάρων στον ποντικό· επομένως, δρα ως ογκογονίδιο.

Έχει αναφερθεί ότι η μεταγραφή της σχετικής ομάδας miRNAs επάγεται από το ίδιο το myc. Ένα ακόμη σημαντικό παράδειγμα ογκογόνου miRNA είναι το miR-155. Άμεσες ενδείξεις της ογκογόνου δράσης του προέρχονται από μελέτες ενός μοντέλου διαγονιδιακών ποντικών με υπερέκφραση αυτού του miRNA στα B-κύτταρα. Αντίστοιχα με αυτά που έχουν παρατηρηθεί στα λεμφώματα των B-κυττάρων του ανθρώπου, τα ποντίκια εμφανίζουν προλευχαιμική πολυκλωνική επέκταση των πρόδρομων B-κυττάρων που ακολουθείται από ανάπτυξη κακοήθειας. Από αυτά τα *in vivo* δεδομένα καθίσταται κατανοητή η άμεση εμπλοκή ενός miRNA στον κακοήγη μετασχηματισμό (3).

## 2.2 Μηχανισμοί απορρύθμισης των miRNAs στον καρκίνο

Τα απορρυθμισμένα επίπεδα έκφρασης των miRNAs είναι ο κύριος μηχανισμός που προκαλεί την απώλεια ή την αυξημένη λειτουργία τους στα καρκινικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι το Myc, αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό μηχανισμό για την αλλαγή της έκφρασης των miRNAs. Γονιδιακές ανωμαλίες μπορούν επίσης να τροποποιήσουν την έκφραση των miRNAs, καθώς η υπερέκφραση των miRNAs έχει συσχετιστεί με γονιδιακή ενίσχυση ενώ η υποέκφρασή τους με χρωμοσωμικές ελλείψεις, σημειακές μεταλλάξεις και απορρυθμισμένη μεθυλίωση υποκινητών. Αρκετά παραδείγματα miRNAs, των οποίων η έκφραση έχει απορρυθμιστεί σε καρκίνους του ανθρώπου, έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα. Ανάμεσά τους συναντάται η περίπτωση της υποέκφρασης των miR-143, miR-145 και των μελών της οικογένειας let-7. Τα miR-143 και miR-145, που βρίσκονται σε μια περιοχή του γονιδιώματος παρόμοια με αυτή που κωδικοποιεί τα miR-15a και miR-16-1, παρουσιάζουν σημαντική υποέκφραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε σύγκριση με το γειτονικό φυσιολογικό βλεννογόνο. Η οικογένεια let-7 υποεκφράζεται σε ποσοστό >50% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, καθώς και σε άλλες νεοπλασίες. Αντίθετα, ένα παράδειγμα υπερέκφρασης miRNAs είναι το miR-155, το οποίο βρίσκεται στη μοναδική φυλογενετικά συντηρημένη αλληλουχία του bic, ενός γονιδίου που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη. Αυτό ανακαλύφθηκε ως θέση εισχώρησης του προϊόντος σε λεμφώματα επαγόμενα από τον ιό ALV (avian leucosis virus). Το miR-155 και το πρόδρομο μετάγραφό του bic υπερεκφράζονται στο λέμφωμα Hodgkin, στο λέμφωμα Burkitt και στο διάχυτο μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα των B-κυττάρων. Ένα άλλο παράδειγμα υπερεκφραζόμενων miRNAs είναι το miR-21 που βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 17q23, μια περιοχή που συχνά είναι ενισχυμένη στον καρκίνο του μαστού και το γλοιοβλάστωμα.

Ένας ιδιαίτερος μηχανισμός που συνδέει τα miRNA με τον καρκίνο αποκαλύφθηκε από την ανάλυση της χρωμοσωμικής μετατόπισης t(8;17) στη λευχαιμία των B-κυττάρων, στην οποία το ρυθμιστικό στοιχείο του miR-142 είναι δίπλα στο πρωτο-ογκογονίδιο myc. Εδώ, ένα ρυθμιστικό στοιχείο ενός miRNA λειτουργεί ως ενεργοποιητής του πρωτο-ογκογονιδίου. Αν και προς το παρόν ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να είναι μοναδικός, δεδομένων των υψηλών επιπέδων και της ειδικής ανά ιστό έκφρασης ορισμένων miRNAs, φαίνεται ωστόσο να είναι ένας μηχανισμός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης όσον αφορά στις γονιδιακές μετατοπίσεις σε καρκίνους του ανθρώπου που δεν έχουν συσχετιστεί ακόμη με τα υπεύθυνα γονίδια (3).

## 2.3 Μονοπάτια που επηρεάζονται

Αρκετές μελέτες έχουν αρχίσει να καθιερώνουν τις μοριακές συσχετίσεις μεταξύ της υποέκφρασης των miRNAs και του κακοήθους μετασχηματισμού. Όπως προαναφέρθηκε, τα miR-15a και miR-16-1 λειτουργούν ως ρυθμιστές της αντιαποπτωτικής ογκοπρωτεΐνης BCL2. Αυτά τα miRNAs κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία βρίσκονται σε χρωμοσωμικές περιοχές που παρουσιάζουν έλλειψη σε ποσοστό >50% των περιπτώσεων CLL. Στη λευχαιμική κυτταρική σειρά MEG-01, η έκφραση των δύο αυτών μορίων οδηγεί σε υποέκφραση του γονιδίου bcl2 και αυξημένη απόπτωση. Επομένως, η απώλεια της έκφρασής τους οδηγεί σε απώλεια ελέγχου της έκφρασης του bcl2 και άρα ενδεχομένως σχετίζεται με την παθολογία της CLL. Πράγματι, ο bcl2 υπερεκφράζεται στη CLL. Παρ' όλα αυτά, αντίθετα από το οξώδες λέμφωμα, η ενεργοποίησή του συσχετίζεται με τη μετατόπιση στην περιοχή που κωδικοποιεί τα IgH.

Η ενεργοποίηση του bcl2 στη CLL φαίνεται να συνδέεται, τουλάχιστον εν μέρει, με τη μειωμένη έκφραση των miR-15a και miR-16-1. Ένας μοριακός σύνδεσμος μεταξύ της απορρύθμισης των miRNAs και του καρκίνου έχει επίσης βρεθεί για μέλη της οικογένειας let-7 που ρυθμίζουν τα ογκογονίδια ras. Η 3'UTR περιοχή του γονιδίου ras περιέχει πολλές θέσεις πρόσδεσης των μελών της οικογένειας let-7. Η ενισχυμένη έκφραση των let-7 σε καρκινικά κύτταρα του ανθρώπου μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Ras. Καθώς το let-7 υποεκφράζεται σε αρκετούς καρκίνους του ανθρώπου, ο εν λόγω μηχανισμός θα μπορούσε να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του Ras μονοπατιού. Η σημασία της υποέκφρασης του συγκεκριμένου miRNA στον καρκίνο υποστηρίζεται από αρκετές ερευνητικές μελέτες που έδειξαν ότι το let-7 καταστέλλει την ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς A549 από καρκίνο του πνεύμονα και της κυτταρικής σειράς DLD-1 από καρκίνο του παχέος εντέρου invitro.

Τα miR-125a/b υποεκφράζονται στον καρκίνο του μαστού. Αυτά τα δύο miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση των υποδοχέων των κινασών τυροσίνης Erbb2 και Erbb3. Η έκτοπη υπερέκφραση των miR-125a ή miR-125b στα κύτταρα SK-BR-3 μειώνει την ανεξάρτητη από πρόσφυση σε υπόστρωμα ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς και την ικανότητα μετανάστευσης και διήθησής τους. Η καταστολή των συγκεκριμένων καρκινικών ιδιοτήτων είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται όταν υποστεί σίγηση η σηματοδότηση από την κινάση ErbB. Η υπόθεση ότι τα υπερεκφραζόμενα miRNAs δρουν ως ογκογονίδια υποστηρίζεται και από τις μελέτες σε in vivo μοντέλα. Ανάμεσα σε αυτά, συναντάται το μοντέλο των διαγονιδιακών ποντικών (miR-155) που

εμφανίζουν προλευχαιμική πολυκλωνική επέκταση των πρόδρομων Β-κυττάρων, η οποία ακολουθείται από κακοήθεια των Β-κυττάρων, και τα διαγονιδιακά (miR-17-92) με λέμφωμα επίσης των Β-κυττάρων. Αυτά τα λεμφώματα χαρακτηρίζονται από την απουσία απόπτωσης, που δείχνει ότι πολλά μέλη της ομάδας miR-17-92 ρυθμίζουν κάποιο προαποπτωτικό γονίδιο. Δύο miRNAs που κωδικοποιούνται από την ομάδα, τα miR-17-5p και miR-20a, καταστέλλουν την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα E2F1. Ο παράγοντας αυτός προάγει τον κυτταρικό κύκλο αλλά επίσης αποτελεί και έναν ισχυρό επαγωγέα της απόπτωσης. Η απουσία απόπτωσης μπορεί να σχετίζεται με τον ισχυρό έλεγχο του E2F1 από την οικογένεια miR-17. Πιο πρόσφατες αναφορές αποκαλύπτουν ότι οι E2F1, E2F2 και E2F3 προσδένονται στον υποκινητή της ομάδας miR17-92, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή της, ενώ το miR-20a, ένα μέλος της ομάδας, τροποποιεί τη μετάφραση των mRNAs των E2F2 και E2F3. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός βρόχου αρνητικής ανάδρασης, η οποία περιλαμβάνει τα miR-20a και E2F και προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που επάγεται από την υπερβολική έκφραση του E2F.

Στους συμπαγείς όγκους του ανθρώπου έχει παρατηρηθεί έκτοπη έκφραση του miR-17 στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ενώ σε πειράματα διαμόλυνσης *in vitro* η υπερέκφραση του miR-17 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από καρκίνο του πνεύμονα. Η υπερέκφραση του miR-17-92 οδηγεί σε αυξημένη αγγειογένεση στον όγκο, μια διαδικασία που συνοδεύεται από υποέκφραση των αντιαγγειογενετικών παραγόντων θρομβοσπονδίνη 1 (Tsp1) και του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού (CTGF) που έχουν προβλεφθεί ως στόχοι των miRNAs της ομάδας.

Η επιμόλυνση καλλιεργημένων κυττάρων γλοιοβλαστώματος και καρκίνου του μαστού με αντι-miRNAs ολιγονουκλεοτίδια (anti-miRNA oligos, AMOs) που στοχεύουν το miR-21 καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη *in vitro* και αυτό φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα απόπτωσης. Το miR-21 υπερεκφράζεται στο χολαγγειοκαρκίνωμα, ενώ η καταστολή του από τα AMOs αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στο χημειοθεραπευτικό παράγοντα γεμισιταβίνη.

Τελευταία, δείχθηκε ότι τα miR-372 και miR-373 συνεργάζονται με τα ογκογονίδια *ras* για το μετασχηματισμό των κυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες. Τα πρωτογενή κύτταρα υφίστανται παύση ανάπτυξης και γήρανση ως απόκριση στα μιτογόνα ερεθίσματα από ογκογονίδια, όπως το *ras*, μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού του p53. Αυτή η απόκριση αντιστρέφεται παρουσία μη λειτουργικού p53. Η υπερέκφραση των miR-372 και miR-373 είναι επαρκής για το μετασχηματισμό των κυττάρων ακόμη και παρουσία του φυσιολογικού p53. Τα δύο αυτά miRNAs

διαφεύγουν του μονοπατιού του p53 που ενεργοποιείται από τα ογκογονίδια αλλά όχι και της εξαρτώμενης από το p53 απόκρισης σε βλάβες του DNA, ένα χαρακτηριστικό των όγκων των γεννητικών κυττάρων των όρχεων (TGCT). Η ομάδα miR-371/373 εκφράζεται στις περισσότερες περιπτώσεις των TGCT, σε αντίθεση με άλλους τύπους όγκων, όπου δεν παρατηρείται το φαινόμενο αυτό. Το εν λόγω γεγονός δείχνει ότι αυτή η ομάδα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. (3)

## 2.4 ΤΑ miRNAs ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ

**Δ**εδομένων των ευρημάτων τα οποία έχουν προέλθει μέσα από την έρευνα που έχει διενεργηθεί, η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs μπορεί, προφανώς, να επηρεάσει τον καρκινικό φαινότυπο. Έτσι, συγκεκριμένα προφίλ έκφρασης των miRNAs μπορούν να αποκαλύψουν τις διακριτές υποκατηγορίες μορφών του καρκίνου.

Πράγματι, αυτό συμβαίνει σε αρκετές περιπτώσεις. Για παράδειγμα, υψηλά επίπεδα miR-155 εμφανίζονται πιο συχνά στο διάχυτο λέμφωμα των μεγάλων B-κυττάρων με ενεργοποιημένο φαινότυπο των B-κυττάρων παρά σε περιπτώσεις με φαινότυπο βλαστικού κέντρου. Επειδή οι ασθενείς με διάχυτο λέμφωμα των μεγάλων B-κυττάρων με ενεργοποιημένο φαινότυπο των B-κυττάρων έχουν κακή πρόγνωση, ίσως η ποσοτικοποίηση του miR-155 να φανεί κλινικά χρήσιμη. Παρόμοια, η υποέκφραση του let-7 στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα συσχετίζεται με κακή πρόγνωση και ελαττωμένη μετεγχειρητική επιβίωση. Τέλος, έχει βρεθεί ότι το προφίλ έκφρασης 13 miRNAs σχετίζεται με την εξέλιξη της CLL στον άνθρωπο. (3)

## 2.5 Τα miRNAs ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

**Τ**α θεραπευτικά miRNAs μπορούν να εισαχθούν στα καρκινικά κύτταρα με στόχο την επιδιόρθωση των επιπέδων των απορρυθμισμένων miRNAs, προκειμένου να επιτευχθεί η αναστροφή κάποιων από τις ιδιότητες των εν λόγω κυττάρων. Αυτές οι θεραπευτικές προσεγγίσεις στοχεύουν στη σίγηση των ογκογονιδίων μετα-μεταγραφικά, μέσω του μονοπατιού της RNA παρεμβολής (RNA interference, RNAi). Σε αυτή τη διαδικασία, ένα μικρό μόριο RNA προκαλεί αποδόμηση ενός συμπληρωματικού του mRNA. Τα κύτταρα χρησιμοποιούν τα ενδογενή miRNAs για

RNAi. Η θεραπευτική RNAi τεχνολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί με δύο τρόπους, κάνοντας χρήση (α) του συνθετικού μικρού RNA (small interfering RNA, siRNA) και (β) της δομής μίσχου-βρόχου μικρού μήκους επάνω σε φορέα (short hairpin RNA, shRNA). Τα siRNAs, όπως και τα miRNAs, είναι δίκλωνα μόρια μήκους 21–23 νουκλεοτιδίων, περιλαμβάνουν προεξοχές δύο νουκλεοτιδίων στα 3' άκρα και μπορούν να ενσωματωθούν άμεσα στο RISC. Τα shRNAs εισάγονται σε φορείς, επομένως συντίθενται στον πυρήνα όπως τα miRNAs. Πρόκειται για δομές μίσχου-θηλιάς, που υφίστανται την ίδια επεξεργασία με τα miRNAs, περιλαμβανομένης της πέψης από την Dicer πριν από την ενσωμάτωση στο RISC. Οι θεραπείες με μικρά μόρια RNA εμφανίζουν πρακτικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Το siRNA υφίσταται εύκολα χημική τροποποίηση, όμως η μαζική παραγωγή αυτών των σύνθετων δομών είναι πολύ δαπανηρή. Αντίθετα, τα shRNAs είναι δύσκολο να τροποποιηθούν αλλά εύκολο να παραχθούν σε ποσότητες. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν μέθοδοι για τροποποιήσεις των shRNA που περιλαμβάνουν αλλαγή της ενσωματωμένης αλληλουχίας, μεταβολή της ρύθμισης του υποκινητή, χρήση διαφορετικών πλασμιδιακών και ιικών φορέων για την επιμόλυνση των κυττάρων και ρύθμιση ή επαγωγή της έκφρασης των shRNAs. Τόσο τα siRNAs όσο και τα shRNAs παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα *in vivo*.

Η τεχνολογία του RNAi έχει αυξήσει τη δυναμική των στοχευόμενων θεραπειών. Αρκετές μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα του RNAi και ορισμένες θεραπείες με βάση το RNAi περνούν τον έλεγχο των κλινικών δοκιμών για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Η αποτελεσματικότητα των siRNAs και των shRNAs εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων, όπως (α) η παράκαμψη της ανοσιακής απόκρισης, (β) η αναποτελεσματικότητα της σίγησης των μορίων-στόχων και (γ) οι πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες, λόγω του περίπλοκου και όχι πλήρως αποσαφηνισμένου ρόλου που διαδραματίζουν τα εκάστοτε μετάγραφα-στόχοι στα βιοχημικά μονοπάτια.

Τα siRNAs με μήκος μεγαλύτερο από 29–30 νουκλεοτίδια επάγουν μια ανοσιακή απόκριση με ιντερφερόνη ανάλογη με αυτή που προκαλεί το δίκλωνο RNA (dsRNA). Το φαινόμενο περιορίζεται με μείωση του μήκους του siRNA ή με χημική τροποποίηση. Τόσο τα siRNAs όσο και τα shRNAs ενεργοποιούν τους υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) και την ανοσιακή απόκριση. Αυτό μπορεί να εξαλειφθεί με τη χρήση μικρών πλασμιδιακών φορέων ή μη μεθυλιωμένων πλασμιδιακών φορέων χωρίς CpG. Το siRNA, ακόμη κι όταν προστατεύεται μέσω χημικών τροποποιήσεων, είναι ευάλωτο σε αποδόμηση και μεταβολικές διαδικασίες. Ενώ το shRNA παρουσιάζει τις επιθυμητές στοχευόμενες δράσεις, όταν είναι παρόν σε <5 αντίγραφα, το siRNA απαιτεί δόσεις σε

κλίμακα nanomolar για τα ίδια αποτελέσματα. Αυτό είναι απόρροια του γεγονότος ότι το shRNA συντίθεται συνεχώς, παράγοντας λιγότερο παροδικά αποτελέσματα.

Από την άλλη πλευρά, θεραπείες που βασίζονται στο RNAi έχουν πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες επιδρούν στη γονιδιακή έκφραση οδηγώντας σε μη επιθυμητούς φαινότυπους. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τέτοια μικρά RNAs μπορούν να προσδεθούν σε μετάγραφα mRNAs με μερική συμπληρωματικότητα. Τα siRNAs, όπως και τα miRNAs, έχουν μια αλληλουχία seed region (SR) από το 2ο-8ο νουκλεοτίδιο που είναι συμπληρωματικό με το 3' άκρο του mRNA.

Χημικές τροποποιήσεις, ειδικά στη θέση 2, μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την ειδικότητα στόχευσης. Ωστόσο, η μεγάλη δόση siRNAs που απαιτείται αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών. Συγκρίνοντας τις θεραπείες με siRNAs έναντι εκείνων με shRNAs ίδιων δόσεων, τα shRNAs έχουν λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες, λόγω των διαφορών στο μηχανισμό δράσης, που έγκειται στον τρόπο ρύθμισής τους (π.χ. τα shRNAs αντιμετωπίζουν την ίδια πυρηνική και κυτταροπλασματική ρύθμιση με τα miRNAs, ενώ τα siRNAs όχι). Η επαγωγή της απόπτωσης από τα miR-15a και miR-16-1 στη CLL, η αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων από το let-7, ο περιορισμός της διήθησης και της μετανάστευσης των κυττάρων που οφείλεται στο miR-125 στον καρκίνο του μαστού και η χρήση anti-miR-21 AMOs για την πρόκληση της προαποπτωτικής απόκρισης στο γλοιοβλάστωμα και στον καρκίνο του μαστού αποτελούν παραδείγματα θεραπευτικής χρήσης των miRNAs. Ως antagomirs ή AMOs χαρακτηρίζονται μόρια νουκλεϊκών οξέων που εμφανίζουν συμπληρωματικότητα προς συγκεκριμένα miRNAs και χρησιμοποιούνται προκειμένου να ελαττωθεί η έκφραση αυτών των miRNAs και, επομένως, και η δράση τους. Όσον αφορά στα anti-miR-21 AMOs, η χρήση τους αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων του χολαγγειοκαρκινώματος στη γεμισταβίνη. Αυτό δείχνει ότι η θεραπεία που βασίζεται σε miRNAs μπορεί να συνδυαστεί με τη χημειοθεραπεία. Το πρώτο εμπόδιο για να είναι μια τέτοια προσέγγιση αποτελεσματική είναι η στόχευση των miRNAs/AMOs στα κύτταρα στόχους in vivo.

Η αύξηση της αποτελεσματικότητας και της σταθερότητας, καθώς και η μείωση της τοξικότητας των AMOs έχει επιτευχθεί μέσω της ανάπτυξης ολιγονουκλεοτιδίων με 2'-O-μεθυλο- ή 2'-O-μεθυλαιθυλο-κατάλοιπα και με τη χρήση νουκλεοτιδίων, όπου ο δακτύλιος της ριβόζης είναι «κλειδωμένος» με μια γέφυρα μεθυλίου που συνδέει το άτομο 2'-O με το άτομο 4'-C (locked nucleic acids, LNA τροποποιημένα νουκλεοτίδια). Ο συνδυασμός DNA/LNA AMOs έχει χρησιμοποιηθεί για την καταστολή του miR-21, με αποτέλεσμα την αύξηση του αποπτωτικού θανάτου σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος. Τα ολιγονουκλεοτίδια που βασίζονται στην τεχνολογία του LNA έχουν αποδειχθεί μη

τοξικά σε δόσεις <5 mg/kg/ημέρα σε ποντίκια και έχουν αντικαρκινικά αποτελέσματα in vivo. Έτσι, είναι πιθανό η θεραπευτική αγωγή για τον καρκίνο in vivo με AMOs να είναι εφικτή. Έχειδειχθεί επίσης ότι η ενδοφλέβια χορήγηση AMOs συνδεδεμένων με χοληστερόλη σε ποντίκια καταστέλλει σημαντικά τη δράση των miR-16, miR-122, miR-192 και miR-194 σε διάφορα όργανα. Ακόμη, καθώς το anti-miR-122 AMO επηρεάζει τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης, τα ποντίκια στα οποία χορηγείται εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα. Προς το παρόν, δεν υπάρχουν αναφορές για την κλινική χρήση των miRNAs. Παρ' όλα αυτά, η αύξηση των μελετών για in vivo χρήση siRNAs και shRNAs για τη σίγηση γονιδίων-στόχων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη τεχνικών χρήσιμων στην καθοδήγηση των miRNAs στα κατάλληλα κύτταρα. Οι αντικαρκινικές προσεγγίσεις που βασίζονται στη συστηματική καθοδήγηση των siRNA/shRNA σε προκλινικά μοντέλα έχουν βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια με τη χρήση ιικών φορέων, λιποσωμάτων και νανοσωματιδίων.

Είναι πιθανόν ότι παρόμοιες προσεγγίσεις θα μπορούσαν να γίνουν με τη χρήση miRNAs ως θεραπευτικών μορίων. Το πλεονέκτημα των miRNAs έναντι των siRNA/shRNA είναι η δυνατότητα που παρέχουν για στόχευση πολλών γονιδίων με ένα μόνο μόριο. Παρόμοια με τα miRNAs, τα siRNAs/shRNAs μπορούν να αλληλεπιδρούν με αρκετούς στόχους, όμως εδώ το φαινόμενο αποτελεί μειονέκτημα λόγω του γεγονότος ότι οι στόχοι είναι μη προβλέψιμοι και πιθανόν προκαλούν ανεπιθύμητες ενέργειες. Για τα miRNAs, η αποκατάσταση της έκφρασής τους στα καρκινικά κύτταρα πιθανότατα αποκαθιστά και το συνολικό δίκτυο των φυσιολογικών αλληλεπιδράσεων.

Μέχρι στιγμής, η διαθεσιμότητα μόνο λίγων ζωικών μοντέλων που έχουν αναπτυχθεί για τα miRNAs που υπερ ή υποεκφράζονται σε καρκίνους περιορίζει σημαντικά τις προκλινικές in vivo μελέτες. Θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστούν νεοπλασίες σε ποντίκια και το προφίλ έκφρασης των απορρυθμισμένων miRNAs σε αυτές για την αναζήτηση αντίστοιχων miRNAs στους ανθρώπους. Πραγματικά, καθώς το ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα εμφανίζει παρόμοιες ανωμαλίες έκφρασης των miRNAs με το ηπατοκαρκίνωμα του ποντικού, είναι πιθανόν η τυχαία ή η επαγόμενη ανάπτυξη νεοπλασιών στα ποντίκια να παρέχει κατάλληλα συστήματα για τον έλεγχο της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας των miRNAs και των AMOs ως θεραπευτικών παραγόντων. (3)



**Πίνακας 1 :** Στην πρώτη στήλη φαίνονται τα απορρυθμισμένα miRNAs, στη δεύτερη αν το εκάστοτε miRNA υπερ- ή υπο-εκφράζεται και στην τρίτη ο τύπος του καρκίνου όπου συμβαίνει η απορρύθμιση. (3)

miRNA	Καρκινικά έναντι φυσιολογικών		Τύπος νεοπλασματος
	Αυξημένη έκφραση	Μειωμένη έκφραση	
let-7-a-2		↓	Καρκίνος μαστού, πνεύμονα, ήπατος
let-7-a-3		↓	Καρκίνος μαστού, ήπατος
let-7d		↓	Καρκίνος μαστού, ήπατος
let-7f		↓	Καρκίνος μαστού, ήπατος, θυρεοειδούς
miR-101		↓	Καρκίνος πνεύμονα, μαστού, αδένωμα υπόφυσης
miR-102	↑		Καρκίνος μαστού, θυρεοειδούς
miR-124a		↓	Καρκίνος πνεύμονα, ήπατος, αδένωμα υπόφυσης
miR-125a		↓	Καρκίνος πνεύμονα, μαστού
miR-125b-1		↓	Καρκίνος μαστού
miR-125b-1	↑		Καρκίνος θυρεοειδούς
miR-125b-2		↓	Καρκίνος μαστού
miR-125b-2	↑		Καρκίνος θυρεοειδούς
miR-140		↓	Καρκίνος πνεύμονα, μαστού, θυρεοειδούς αδένωμα υπόφυσης
miR-141		↓	Καρκίνος ήπατος, θυρεοειδούς
miR-142		↓	Καρκίνος ήπατος, αδένωμα υπόφυσης
miR-143		↓	Καρκίνος μαστού, πνεύμονα, ήπατος
miR-145		↓	Καρκίνος μαστού, πνεύμονα, ήπατος
miR-146	↑		Καρκίνος πνεύμονα, θυρεοειδούς
miR-150	↑		Καρκίνος πνεύμονα, αδένωμα υπόφυσης
miR-155	↑		Καρκίνος πνεύμονα, μαστού, θυρεοειδούς, λέμφωμα
miR-15b		↓	Καρκίνος θυρεοειδούς, αδένωμα υπόφυσης
miR-181a		↓	Καρκίνος ήπατος
miR-181a	↑		Καρκίνος θυρεοειδούς
miR-181b		↓	Γλοιοβλάστωμα, αδένωμα υπόφυσης
miR-181c		↓	Καρκίνος ήπατος, γλοιοβλάστωμα
miR-181c	↑		Καρκίνος θυρεοειδούς

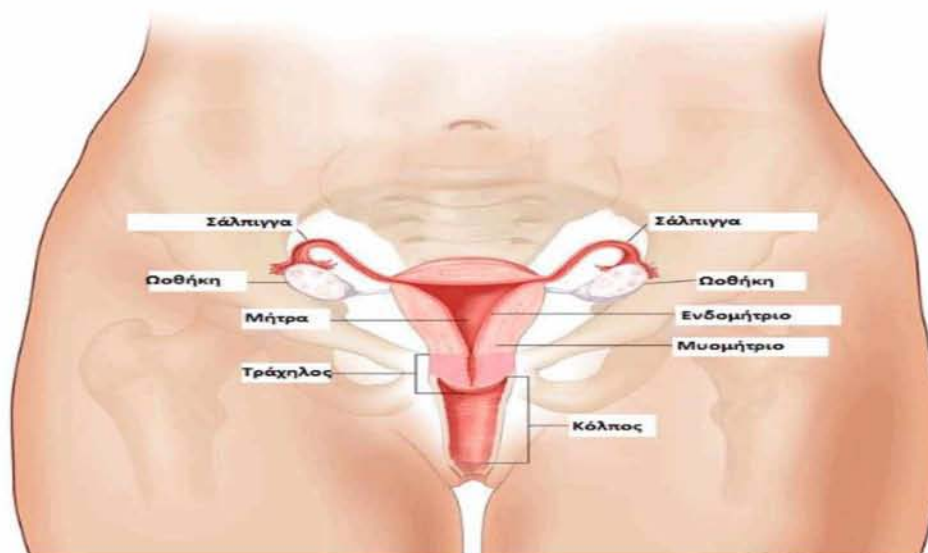
miR-191	↑		Καρκίνος πνεύμονα, μαστού, αδένωμα υπόφυσης
miR-192	↑		Καρκίνος πνεύμονα, αδένωμα υπόφυσης
miR-198		↓	Καρκίνος πνεύμονα, γλοιοβλάστωμα
miR-199b		↓	Καρκίνος πνεύμονα, ήπατος
miR-202	↑		Καρκίνος μαστού, θυρεοειδούς
miR-203	↑		Καρκίνος πνεύμονα, μαστού
miR-21	↑		Καρκίνος μαστού, πνεύμονα, θυρεοειδούς, γλοιοβλάστωμα
miR-210	↑		Καρκίνος πνεύμονα, μαστού
miR-212	↑		Καρκίνος πνεύμονα, αδένωμα υπόφυσης
miR-213		↓	Καρκίνος μαστού, θυρεοειδούς
miR-219-1		↓	Καρκίνος πνεύμονα, θυρεοειδούς
miR-220		↓	Καρκίνος πνεύμονα
miR-220	↑		Καρκίνος θυρεοειδούς
miR-221	↑		Γλοιοβλάστωμα, καρκίνος ήπατος, θυρεοειδούς
miR-222	↑		Καρκίνος θυρεοειδούς
miR-24-2	↑		Καρκίνος πνεύμονα, θυρεοειδούς

### **III. ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΙ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ. ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΙ

Είναι καρκίνοι του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος και εμφανίζονται όταν αναπτύσσονται ανώμαλα κύτταρα ανεξέλεγκτα. Οι γυναικολογικοί καρκίνοι παίρνουν το όνομά τους με βάση το όργανο ή το μέρος του σώματος το όπου πρωτοπαρουσιάζονται, συμπεριλαμβανομένων των ωοθηκών, της μήτρας, του τραχήλου, της κολπικής κοιλότητας και του αιδοίου.

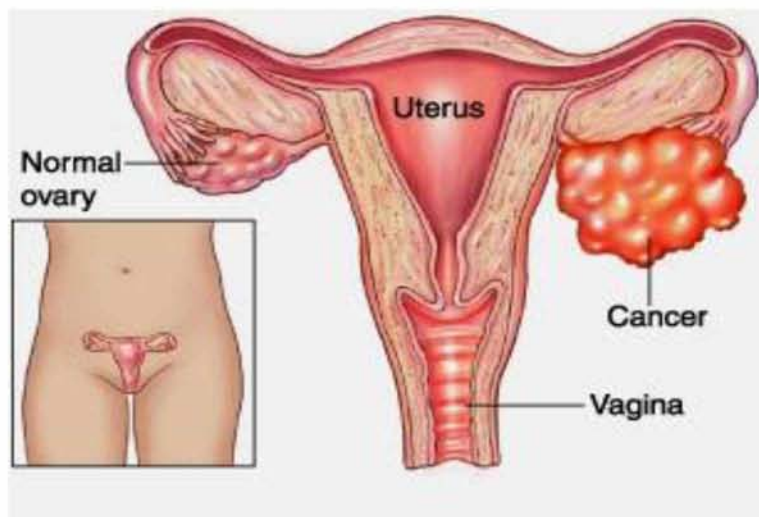
Στους υπόλοιπους τύπους γυναικολογικών καρκίνων περιλαμβάνονται ο καρκίνος των φαλλόπειων σαλπίγγων και ο καρκίνος του πλακούντα (καρκίνος που σχετίζεται με την εγκυμοσύνη) (4)



Εικόνα 5: Ανατομία γυναικείων γυναικολογικών οργάνων.

### 3.1 Καρκίνος των Ωοθηκών

Οι ωοθήκες είναι μέρος του γυναικείου συστήματος αναπαραγωγής. Υπάρχει μια ωοθήκη σε κάθε πλευρά της μήτρας. Βρίσκονται χαμηλά μέσα στη κοιλιά, αριστερά και δεξιά της μήτρας. Παράγουν τις γυναικείες ορμόνες και απελευθερώνουν τα ωάρια. Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι ένας κακοήθης όγκος στη μία ή και στις δυο ωοθήκες. Υπάρχουν δύο τύποι, ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών, που είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου των ωοθηκών και ο μη επιθηλιακός καρκίνος.

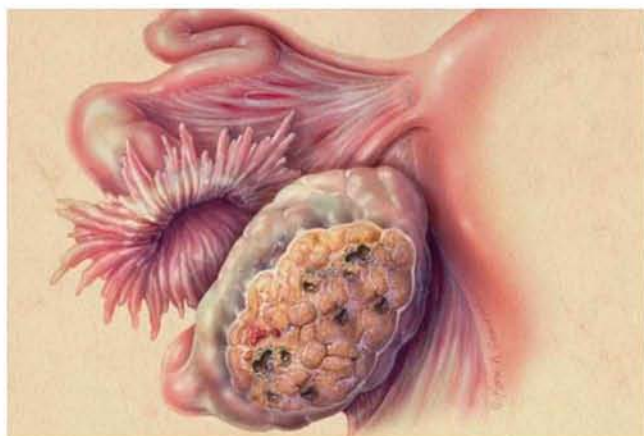


Εικόνα 6: Μήτρα – ωοθήκες και καρκίνος

Ο κίνδυνος να εμφανίσει μια γυναίκα καρκίνο ωοθηκών κατά τη διάρκεια της ζωής είναι 1%. Όμως η πιθανότητα αυτή ανεβαίνει στο 2,5% όταν υπάρχει μία συγγενής πρώτου βαθμού και στο 30-40% όταν υπάρχουν δύο συγγενείς πρώτου βαθμού με ανάλογο ιστορικό. Έτσι, είναι σαφές ότι η νόσος έχει κληρονομική προδιάθεση. Η ασθένεια αυτή μπορεί να εμφανιστεί μόνη της ή να συνδυαστεί με καρκίνο μαστού ή με καρκίνο εντέρου.

Ποιοι είναι οι παράγοντες κινδύνου?

- Μία ή περισσότερες συγγενείς πρώτου βαθμού (μητέρα, αδερφή, θυγατέρα) με καρκίνο στις ωοθήκες ή μαστού
- Οικογενειακό ιστορικό μαστού, ενδομητρίου ή καρκίνου εντέρου
- Ιστορικό μη γονιμότητας ή χρήση φαρμάκων γονιμότητας
- Εβραϊκή Ασκενάζυ κληρονομικότητα και οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή της ωοθήκης
- Μια μετάλλαξη στο γονίδιο BRCA1 ή BRCA2 ( γνωστό ως γονίδιο καρκινικής ευπάθειας μαστού – ωοθήκης) (5)



Εικόνα 7: Ωοθηκικός καρκίνος

Οι χημικές ουσίες που παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα, όπως πρωτεΐνες, ανιχνεύονται στο αίμα. Ονομάζονται καρκινικοί δείκτες. Η εξέταση αίματος θα προσδιορίσει το επίπεδο των καρκινικών δεικτών. Άλλες εξετάσεις περιλαμβάνουν κοιλιακό υπερηχογράφημα, διακολπικό υπερηχογράφημα, αξονική τομογραφία (CT), μαγνητική τομογραφία (MRI), ακτινογραφίες. Ο εντοπισμός της έκτασης της εξάπλωσης του καρκίνου ονομάζεται “σταδιοποίηση”. Η σταδιοποίηση του καρκίνου βοηθάει τους γιατρούς να αποφασίσουν το είδος της θεραπευτικής αγωγής.

Μια απλουστευμένη μορφή ενός συστήματος σταδιοποίησης περιγράφεται παρακάτω:

- Στάδιο I – Ο καρκίνος βρίσκεται στη μία ή και στις δύο ωοθήκες.
- Στάδιο II – Ο καρκίνος βρίσκεται στη μία ή και στις δύο ωοθήκες και έχει εξαπλωθεί σε άλλα κοντινά όργανα.
- Στάδιο III – Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στα εσωτερικά τοιχώματα της κοιλιάς, των εντέρων ή των λεμφαδένων της κοιλιάς και της λεκάνης.
- Στάδιο IV – Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί έξω από την κοιλιά, για παράδειγμα, στο συκώτι, στους πνεύμονες ή σε μακρινούς λεμφαδένες.

Η θεραπεία για τον καρκίνο των ωοθηκών εξαρτάται από το είδος του καρκίνου, το στάδιο, τη γενική κατάσταση της υγείας και την καλή φυσική κατάσταση της ασθενούς, τις συστάσεις των γιατρών. Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών συνήθως αντιμετωπίζεται με χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία. Οι οριακοί όγκοι αντιμετωπίζονται με χειρουργική επέμβαση. Ο μη επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών αντιμετωπίζεται με χειρουργική επέμβαση ή/και χημειοθεραπεία. (5)

### 3.2 Καρκίνος της μήτρας – ενδομητρίου

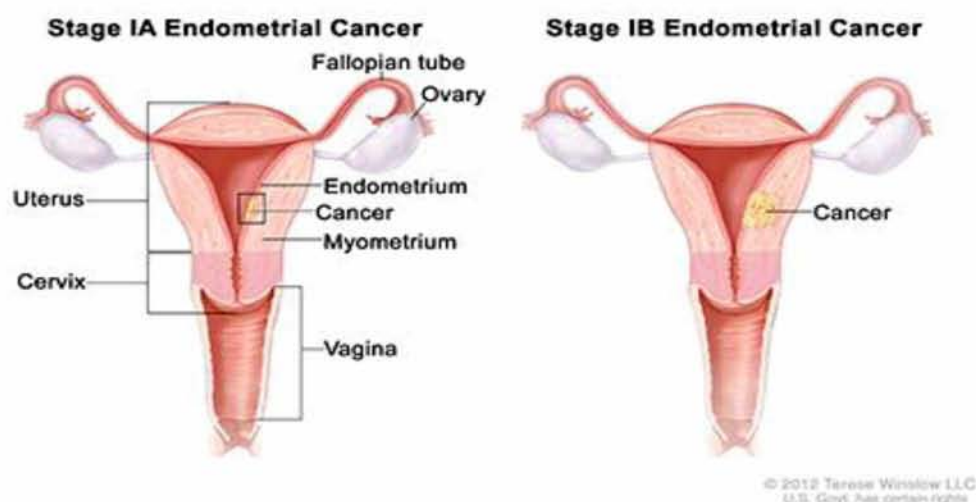
Η μήτρα είναι ένα όργανο που έχει σχήμα και μέγεθος αχλαδιού, και αποτελείται από το σώμα, το ενδομήτριο, δηλαδή το εσωτερικό της (εκεί αναπτύσσεται το έμβρυο) και τον τράχηλο. Η μήτρα βρίσκεται στην μικρή πύελο της γυναίκας. Ο καρκίνος της μήτρας αναπτύσσεται στο ενδομήτριο ή στο σώμα της. Ο καρκίνος του ενδομητρίου είναι ένας από τους συνηθέστερους καρκίνους του γυναικείου γενετικού συστήματος. Σε ποσοστό 70% εμφανίζεται στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κυρίως μεταξύ 55 και 65 χρονών.



Ο καρκίνος της μήτρας είναι η δεύτερη πιο συχνή αιτία θνησιμότητας από γυναικολογικό καρκίνο, μετά τον καρκίνο των ωοθηκών. Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου είναι 1 στις 40 κατά τη διάρκεια της ζωής. Συνδέεται με την παχυσαρκία, το σακχαρώδη διαβήτη, την υπέρταση, την υπερλιπιδαιμία, την αυξημένη παραγωγή οιστρογόνων, τη μη τεκνοποίηση, τις διαταραχές κύκλου και ανωορρηκτικούς κύκλους, την υπογονιμότητα, τη πρόωμη εμμηναρχή και τη καθυστερημένη εμμηνόπαυση, φάρμακα όπως η ταμοξιφαίνη, την υπερπλασία του ενδομητρίου, τη δίαιτα που περιλαμβάνει αυξημένη κατανάλωση ζωικού λίπους και πρωτεϊνών και τη γενετική προδιάθεση και ιδιαίτερα το σύνδρομο LynchII (βλέπε καρκίνος παχέος εντέρου).

Με βάση, επομένως, τους πιθανούς παθογενετικούς μηχανισμούς καρκινογένεσης διακρίνουμε δύο τύπους καρκίνου του ενδομητρίου.

- Ο **τύπος 1** αναπτύσσεται σε γυναίκες με συνεχή και μακροχρόνια επίδραση των οιστρογόνων και συνοδεύεται από πεπαχυσμένο ενδομήτριο (υπερπλασία ενδομητρίου η οποία διαγιγνώσκεται με το ενδοκολπικό υπερυχογράφημα). Ο τύπος 1



Εικόνα 8: Ανατομία μήτρας και καρκίνος

καρκίνου του ενδομητρίου είναι πολύ πιο συχνός και αντιπροσωπεύει περίπου το 80% του καρκίνου του ενδομητρίου.

- Ο **τύπος 2** παρατηρείται σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας, είναι ανεξάρτητος από την ορμονική επίδραση, παρουσιάζεται σε ατροφικό ενδομήτριο και επομένως δεν συνοδεύεται από υπερπλασία (δηλαδή πεπαχυσμένο ενδομήτριο) ενώ έχει χειρότερη πρόγνωση με περισσότερες πιθανότητες να διηθεί το μυομήτριο κατά τη διάγνωση και μεγάλη συχνότητα μεταστατικής εξάπλωσης σε πυελικούς λεμφαδένες.

### 3.3 Καρκίνος του τραχήλου

Ο τράχηλος είναι το κατώτερο τμήμα της μήτρας. Έχει σχήμα σωλήνος, μήκους περί τα 2-3 cm. Ο τράχηλος, παρεμβάλλεται ανατομικά μεταξύ της μήτρας και του κόλπου. Χωρίζεται σε δύο μοίρες (τμήματα): την ενδοκολπική και την υπερκολπική. Το εσωτερικό του αυλού του τραχήλου κατά το ενδοκολπικό του τμήμα, επενδύεται (καλύπτεται) από πολλούς στίχους κυττάρων πλακώδους μορφής (πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο).

Το αντίστοιχο υπερκολπικό τμήμα επενδύεται από ένα στίχο κυττάρων κυλινδρικού σχήματος (μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο). Στο τμήμα αυτό, υπάρχει εκκριτική δραστηριότητα και παράγεται βλέννη από τραχηλικούς αδένες. Η τραχηλική βλέννη προφυλάσσει, ως πώμα, από την είσοδο μικροβίων στην μήτρα και στις σάλπιγγες και χρησιμεύει για την παραλαβή και ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων κατά την γενετήσια (σεξουαλική) επαφή. Η περιοχή όπου ο μονός στίχος κυλινδρικών κυττάρων του τραχήλου, μεταβάλλεται στους πολλούς στίχους των πλακωδών κυττάρων, είναι γνωστή ως ζώνη μεταπτώσεως. Η ζώνη αυτή, αποτελεί την κύρια περιοχή αναπτύξεως του καρκίνου του τραχήλου.

Τα αίτια της νόσου δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας έχει συσχετισθεί με ορισμένους παράγοντες οι οποίοι φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωσή του.

Τέτοιοι παράγοντες είναι οι παρακάτω:

- Το κάπνισμα όπως και σε άλλες περιπτώσεις έχει συσχετιστεί με την καρκινογένεση.
- Η ηλικία. Η νόσος παρουσιάζεται συχνότερα σε μεγαλύτερες γυναίκες (μέσης ηλικίας).
- Η μόλυνση από ιούς της κατηγορίας HPV (Human Papilloma Virus) φαίνεται να προάγει την καρκινογένεση. Ο ιός αυτός είναι γενετήσια (σεξουαλικά) μεταδιδόμενος και είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία κονδυλωμάτων.
- Η σεξουαλική δραστηριότητα σε νεαρή ηλικία καθώς και η εναλλαγή πολλών ερωτικών συντρόφων, ενοχοποιούνται για εμφάνιση της νόσου – ίσως λόγω της έκθεσης στους ιούς της κατηγορίας HPV. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι πολύ σπάνιος σε παρθένες.
- Η αμέλεια να επισκεφθούν τον γυναικολόγο ενοχοποιείται για εμφάνιση αυτού του καρκίνου σε πολλές γυναίκες. Το τεστ Παπανικολάου μπορεί να εντοπίσει προκαρκινικές καταστάσεις των κυττάρων του τραχήλου. Παρατηρείται μεγαλύτερος

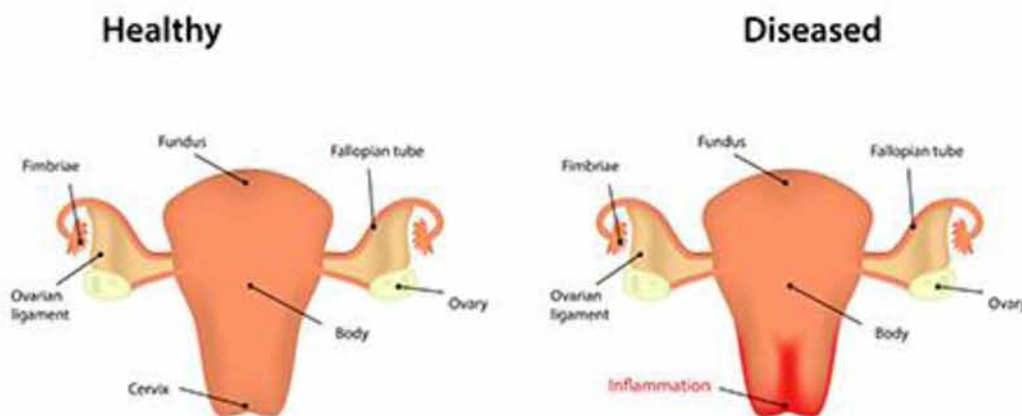


επιπολασμός της νόσου σε γυναίκες που δεν έχουν επισκεφθεί ποτέ τον γυναικολόγο τους ή δεν έχουν κάνει ποτέ τεστ Παπανικολάου. (5)

### 3.4 Καρκίνος του κόλπου

**Α**ν και δε θεωρείται μία από τις πιο συχνές μορφές της νόσου, συχνά δε διαγιγνώσκεται άμεσα επειδή στην πρόωμη μορφή του μπορεί να μην εμφανίσει συμπτώματα. Πρόκειται όμως για τον καρκίνο που αναπτύσσεται στην περιοχή των γυναικείων γεννητικών οργάνων και ειδικότερα στο σωληνοειδές όργανο που ξεκινά από τον τράχηλο και καταλήγει στο άκρο του αιδοίου. Στην περιοχή αυτή μπορεί να αναπτυχθούν καρκινώματα πλακωδών κυττάρων καθώς και αδеноκαρκινώματα.

Μέχρι στιγμής οι επιστήμονες δεν μπορούν να αποφανθούν με ακρίβεια για τα αίτια που μπορεί να δημιουργήσουν καρκίνο του κόλπου. Εκτιμάται πως η ύπαρξη του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) αυξάνουν την πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου του κόλπου στις γυναίκες. Η μεγάλη ηλικία είναι επίσης ένας παράγοντας που συμβάλει αρνητικά για την εμφάνιση της ασθένειας, καθώς τα περισσότερα περιστατικά έχουν διαγνωσθεί σε γυναίκες άνω των 60 ετών, χωρίς βέβαια να αποκλείεται η ανάπτυξη του καρκίνου του κόλπου ακόμη και σε νεαρά κορίτσια μετά τα 20 έτη. Παράλληλα για την εκδήλωση του καρκίνου του κόλπου έχει ενοχοποιηθεί ένα φάρμακο το diethylstilbestrol, το οποίο ήταν μία ανδρική ορμόνη και είχε αρχίσει να χορηγείται τη δεκαετία του 50 στις γυναίκες που είχαν ιστορικό αποβολών. Αργότερα βρέθηκε πως το συγκεκριμένο σκεύασμα ήταν πιθανό να προκαλέσει την ανάπτυξη καρκίνου του κόλπου ενώ επιβαρημένα φαίνεται να είναι και τα παιδιά των γυναικών που είχαν λάβει τη συγκεκριμένη ουσία η οποία ενοχοποιήθηκε για την εμφάνιση αδеноκαρκινωμάτων του κόλπου. Κύριο σύμπτωμα είναι η ανώμαλη κολπική αιμόρροια. (5)



Εικόνα 9: Αριστερά – υγιής μήτρα, Δεξιά – μήτρα με φλεγμονή

### 3.5 Καρκίνος του αιδοίου

Ξεκινά στο αιδοίο που είναι το εξωτερικό τμήμα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Περιλαμβάνει το στόμιο της κολπικής κοιλότητας, τα εσωτερικά και τα εξωτερικά χείλη (λέγονται και μικρά και μεγάλα χείλη του αιδοίου), την κλειτορίδα και το εφίβαιο (έναν μαλακό, λιπώδη λοφίσκο ιστού που βρίσκεται επάνω από τα χείλη).

Οι κακοήθεις όγκοι του αιδοίου είναι πλακώδη καρκινώματα σε ποσοστό περισσότερο από 90% και μελάνωμα σε ποσοστό 5- 10%. Αδενοκαρκίνωμα, σάρκωμα, βασικοκυτταρικό καρκίνωμα κ.α. είναι τα υπόλοιπα. Οι συνήθεις θέσεις ανάπτυξης του όγκου είναι τα μεγάλα χείλη, τα μικρά χείλη, η κλειτορίδα και το περίνεο.

- Πλακώδες καρκίνωμα: Δεν φαίνεται να αναπτύσσεται από τις ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες. Μόνο 2-4% από αυτές μεταπίπτει σε διηθητικό καρκίνωμα. Αυτοί οι όγκοι μεγαλώνουν τοπικά, εξαπλώνονται στους επιφανειακούς και εν τω βάθει βουβωνικούς λεμφαδένες και μετά εξαπλώνονται στους πνευλικούς. Η αιματογενής διασπορά γίνεται μετά την διήθηση των λεμφαδένων και ο θάνατος επέρχεται από καχεξία ή αναπνευστική ανεπάρκεια από πνευμονικές μεταστάσεις.

- Κακόηθες μελάνωμα: Αποτελεί το 5% των περιπτώσεων των μελανωμάτων παρόλη την μικρή έκταση της περιοχής. Όλες οι μελαγχρωματικές βλάβες του αιδοίου πρέπει να αφαιρούνται.

- Paget νόσος του αιδοίου: Είναι μια προδιηθητική κατάσταση με πάχυνση του επιθηλίου και διήθηση από βλεννώδη κύτταρα Paget. 10-12% των ασθενών έχουν διηθητική νόσο Paget και 4-8% έχουν και αδενοκαρκίνωμα το οποίο δεν είναι προφανές. Τοπική υποτροπή συμβαίνει σε πολλά χρόνια και οι υποτροπές είναι σχεδόν πάντα in situ. Οι γυναίκες έχουν προδιάθεση για εξωγενετικά αδενοκαρκινώματα και πρέπει να γίνεται καλή κλινική εκτίμηση και παρακολούθηση.

- Αδενοκαρκίνωμα του Βαρθολίνειου αδένου: Είναι εξαιρετικά σπάνιο και παρατηρείται σε ηλικιωμένες γυναίκες. Η φλεγμονή σε γυναίκες άνω των 50 ετών είναι σπάνια και ανύπαρκτη σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα και σαρκώματα του αιδοίου: Έχουν φυσική ιστορία παρόμοια με αυτή όταν εμφανίζονται σε άλλα σημεία του σώματος. (5)

# **IV. ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ microRNA ΣΕ ΟΡΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥΣ**

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV. ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ microRNA ΣΕ

## ΟΡΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥΣ

### ΚΑΡΚΙΝΟΥΣ

#### 4. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών (EOC) είναι μια πολύπλοκη ασθένεια, και έχουν αναγνωριστεί πολλοί ιστολογικοί υπότυποι. Υπήρξε σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της κυτταρικής και της μοριακής βιολογίας αυτής της ανθρώπινης κακοήθειας, ωστόσο το ποσοστό επιβίωσης των γυναικών με EOC έχει αλλάξει ελάχιστα καθώς η θεραπεία περισσότερο από 30 χρόνια βασίζεται στη πλατίνα. Από το 2006, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχουν δείξει τον ουσιαστικό ρόλο των microRNAs (miRNAs) στην ογκογένεση του καρκίνου των ωοθηκών. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το προφίλ των miRNA συνδέεται με διαφορετικές πτυχές του καρκίνου των ωοθηκών (τους υπότυπους του όγκου, το στάδιο, τον ιστολογικό βαθμό, την πρόγνωση και την αντίσταση στη θεραπεία) και έδειξε ένα κρίσιμο ρόλο για τα miRNAs στην παθογένεια και την εξέλιξη του EOC. Στην παρούσα ανασκόπηση, θα συζητήσουμε τα τρέχοντα δεδομένα σχετικά με τη συσσώρευση αποδείξεων της ρυθμισμένης έκφρασης των miRNAs στο EOC, το ρόλο τους στη διάγνωση, τη πρόγνωση και τη πρόβλεψη στην ανταπόκριση της θεραπείας. Δεδομένης της ετερογένειας της ασθένειας αυτής, είναι πιθανό ότι η μακροπρόθεσμη αύξηση επιβίωσης θα μπορούσε να επιτευχθεί και με τη μετάφραση των πρόσφατων συμμετοχών miRNAs στο EOC σε νέες στοχευμένες θεραπείες που θα έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη διαχείριση του καρκίνου των ωοθηκών.

#### 4.1 Εισαγωγή

Είναι ο πιο θανατηφόρος γυναικολογικού τύπου καρκίνος. Η έγκαιρη ανίχνευση στα στάδια I και II οδηγεί σε ποσοστό 60-90% σε 5 χρόνια επιβίωση των ασθενών, ωστόσο η διάγνωση στα στάδια III και IV έχει ως αποτέλεσμα να μειώνει σημαντικά το ποσοστό επιβίωσης περίπου στο 33%, με το χειρότερο ποσοστό

επιβίωσης (19%) που παρατηρήθηκε για το στάδιο IV . Τα ποσοστά επιβίωσης έχουν μειωθεί περαιτέρω στο 27% στη διάγνωση στα εξ αποστάσεως στάδια. Κατά μέσο όρο, ένα ποσοστό 5ετούς επιβίωσης του 44% έχει αναφερθεί για ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών . Περισσότερα από τα δύο τρίτα των περιπτώσεων καρκίνου των ωοθηκών διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο που συνήθως συνδέονται με αντίσταση στη χημειοθεραπεία και υποτροπή της νόσου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να είναι ο όγδοος πιο κοινός γυναικολογικός καρκίνος που καταλαμβάνει όλο τον κόσμο στην έκτη θέση των εκτιμώμενων θανάτων για καρκίνο των γυναικών στις αναπτυγμένες χώρες .

Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών (EOC) χωρίζεται παραδοσιακά σε διάφορες υποκατηγορίες που οφείλεται σε μια εκτεταμένη ιστοπαθολογική ετερογένεια: ορώδης (πιο συνηθισμένο, ~ 70% της EOC), βλεννώδης, ενδομητριοειδές, διαυγοκυτταρικός (clear-cell), μεταβατικού επιθηλίου, ή συνδυασμοί αυτών (μικτοί) τύποι είναι αναγνωρίσιμοι .

EOC έχουν αναπτυχθεί από τα απλά πεπλατυσμένα επιθηλιακά κύτταρα σε τέσσερις διαφορετικούς ιστοτύπους που μοιάζουν με τα καλά-διαφοροποιημένα κύτταρα της σάλπιγγας (ορώδης, ο πιο κοινός με 7 από τις 10 επιθηλιακούς καρκίνους ωοθηκών), του ενδομητρίου (ενδομητριοειδές, 1 από τους 20 επιθηλιακούς καρκίνους ωοθηκών ), ενδοτράχηλου (βλεννώδης, 1 στους 10 επιθηλιακούς καρκίνους των ωοθηκών), και τα κύτταρα που σχηματίζουν φωλιές εντός του κόλπου (clear-cell, ο λιγότερο συχνός υπότυπος του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών με μόλις 3 στις 100 περιπτώσεις).

Ένα σημαντικό ποσοστό των ενδομητριοειδών καρκινωμάτων και καρκινωμάτων clear-cell συνδέονται με προϋπάρχουσα ενδομητρίωση. Το ορώδες καρκίνωμα μπορεί να ταξινομηθεί σε υψηλής ποιότητας (HGSC) και χαμηλής ποιότητας όγκων (LGSC). Οι περισσότεροι HGSCs είναι βιολογικά επιθετικά νεοπλάσματα, και συχνά εκδηλώνονται σε προχωρημένο στάδιο, με έως και 85% των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών με ορώδες καρκίνωμα να εμφανίζουν εκτεταμένη περιτοναϊκή μεταστάση. Έως και το 80% των HGSCs δείχνουν αρχική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα, αλλά περίπου το 70% μπορεί να εμφανίσει επανάληψη. LGSC συμπεριφέρεται με αργή ανάπτυξη, βραδεία νεοπλάσματα (προφανώς λόγω της έλλειψης μεταλλάξεων του p53) και έχει καλύτερη πρόγνωση. Σε αντίθεση με τα HGSCs, που υποτροπιάζουν, τα LGSCs έχουν υψηλή αντίσταση στα φάρμακα πακλιταξέλη, καρβοπλατίνη και σισπλατίνη (33-69% των περιπτώσεων), αλλά χαμηλή αντίσταση φαρμάκου στην ετοποσίδη και δοξορουβικίνη. Τα ενδομητριοειδές καρκινώματα είναι όγκοι που είναι ευαίσθητοι στη πλατίνα και, λόγω της χαμηλής ποιότητας στο πρώιμο στάδιο της νόσου έχουν καλύτερη ευαισθησία στη χημειοθεραπεία, συνδέονται με πιο ευνοϊκή πρόγνωση μεταξύ όλων των υποτύπων του EOCs. Τα βλεννώδες νεοπλάσματα αντιπροσωπεύουν το 10-15% όλων

των ωοθηκικών όγκων και έως και 80% των βλεννώδων νεοπλασμάτων που είναι καλοήγη κυσταδενώματα.

Τα καρκινώματα Clear-cell είναι βιολογικά επιθετικά νεοπλάσματα παρά το γεγονός της διάγνωσης σε πρώιμο στάδιο. Στην περίπτωση αυτή, η υποτροπή μετά από χειρουργική επέμβαση είναι κοινή. Τα Clear-cell, οι βλεννώδεις καρκίνοι καθώς και οι ορώδεις και ενδομητριοειδείς καρκίνοι γενικά δεν ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία με βάση τη πλατίνη και τη ταξάνη. Με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά, οι πιο πρόσφατες απόψεις προτείνουν θεραπεία του EOC είτε στο τύπου 1 (πρώιμα στάδια, νωχελική κλινική πορεία και σπάνια TP53 μεταλλάξεις), ή τύπου 2 (προχωρημένα στάδια, επιθετική, γενετικά εξαιρετικά ασταθής με ~ 80% τη συχνότητα των μεταλλάξεων TP53) (6).

## 4.2 Τα miRNA ως διαγνωστικά εργαλεία για το καρκίνο των ωοθηκών

Τα τεχνικά χαρακτηριστικά ολόκληρου του γονιδιώματος των miRNA έχει δείξει τη χρησιμότητά τους για την ταξινόμηση των όγκων σχετικά με την προέλευσή τους και την κατάσταση διαφοροποίησής τους ώστε να βοηθήσουν στη διάγνωση και τη πρόγνωση. Όπως συζητήθηκε, αρκετές αναφορές έχουν δείξει αυτό το χαρακτηριστικό των miRNA για διάφορους τύπους όγκων. Η πρώτη έκθεση της απορύθμισης των miRNA στον καρκίνο των ωοθηκών προήλθε το 2007: όπου το προφίλ έκφρασης των miRs έδειξε τη διάκριση μεταξύ δειγμάτων ωοθηκικού καρκίνου και δειγμάτων με φυσιολογικές ωοθήκες (Iorio et al., 2007) (Πίνακας 1). Τα miR-200a και miR-141 ταυτοποιήθηκαν έχοντας αυξημένη έκφραση στον καρκίνο, ενώ τα miR-199a, miR-140, το miR-145 και το miR-125b1 είχαν σημαντικά μειωμένη έκφραση.

Σε αυτή τη μελέτη, ο ρόλος της απορρύθμισης των miRNA χρησιμοποιήθηκε επίσης για την διαφοροποίηση των ιστολογικών υποτύπων των ωοθηκικών καρκίνων. Για παράδειγμα, τα miR-200a και miR-200c παρουσίασαν αύξηση σε όλους τους υποτύπους (βλεννώδεις, ενδομητριοειδείς, και διαυγοκυτταρικό), τα miR-200b και miR-141 παρουσίασαν αύξηση στον ορό στο ενδομητριοειδές καρκινώμα, και τα miR-21, miR-203 και miR-205 παρουσίασαν αύξηση μόνο σε ενδομητριοειδές καρκινώματα. Πράγματι, το miR-145 είχε μειωμένη έκφραση στον ορό σε διαυγοκυτταρικό καρκινώμα, ενώ το miR-222 είχε μειωμένη έκφραση και σε ενδομητριοειδές και διαυγοκυτταρικό καρκινώμα. Αργότερα, το εργαστήριο Coukos επισήμανε τη μειωμένη έκφραση των miRNAs σε κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών και σε δείγματα καρκίνου (Zhang et al., 2008). Οι ερευνητές εντόπισαν διαφορετική έκφραση των 44

miRNAs μεταξύ του πρώιμου και του όψιμου σταδίου καρκίνου των ωοθηκών με μια πλήρη μειωμένη έκφραση για όλα τα miRNAs σε όγκους προχωρημένου σταδίου. Οι αποτυπώσεις αυτές περιλαμβάνουν τρεις γνωστούς ογκο-καταστολείς των miRNAs, τα miR-15a, 34a-mir, και miR-34b. Οι ερευνητές έδειξαν επίσης ότι η περιοχή που περιέχει την αυξημένη έκφραση του miR-182 ενισχύθηκε στο 28,9% σε ωοθηκικά καρκινώματα, ενώ το miR-15a διεγράφηκε κατά 23,9% σε ωοθηκικά καρκινώματα ([Calin et al., 2002](#)).

Επίσης ευρέως γονιδιακές μελέτες για τα miRNA πραγματοποιήθηκαν και καθόρισαν την εμφάνιση ενός μεγάλου αριθμού απορρυθμιστικών miRNA σε όγκους των ωοθηκών. Μέχρι σήμερα, [Nam et al. \(2008\)](#) προσδιόρισαν 23 παρεκκλίνοντα εκφραζόμενα miRNAs σε τουλάχιστον 60% των δειγμάτων με ωοθηκικό καρκίνο, όπου το miR-21 ως το πλέον με αυξημένη έκφραση (σε 85% των δειγμάτων) και το miR-125b με μειωμένη έκφραση των miRNAs (σε 95% των δειγμάτων).

[Yang et al. \(2008a\)](#) εντοπίστηκαν 36 miRNAs που εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ φυσιολογικών ωοθηκικών κυττάρων και όγκων, συμπεριλαμβανομένου των miR-199a \*, miR-214, το miR-200a που βρέθηκαν να υπερεκφράζονται σε 53%, 56%, και 43% σε όγκους ιστών, αντίστοιχα, και συνδέονται με υψηλής ποιότητας όγκους προχωρημένου σταδίου. Το miR-100 ταυτοποιήθηκε με μειωμένη έκφραση σε 76% των όγκων. Σε αντίθεση με αυτά τα δεδομένα, [Eitan et al. \(2009\)](#) προσδιόρισε τα miR-200a, miR-34a, και miR-449b με μειωμένη έκφραση miRNAs σε προχωρημένο στάδιο (σταδίου III), όπου οι όγκοι των ωοθηκών με miR-200a που συμμετέχουν στη νόσο σε πρώιμο στάδιο παρουσίασαν βελτίωση στη συνολική επιβίωση. Το miR-200a επισημάνθηκε επίσης ως προγνωστικός δείκτης σε μια ομάδα με 55 ασθενείς με προηγμένους όγκους των ωοθηκών ([Hu et al., 2009](#)). Ένα άλλο μέλος της οικογένειας των miR-200, miR-200c, από [Marchini et al. \(2011\)](#), συνδέεται με την εξέλιξη της ελεύθερης επιβίωσης, τη συνολική επιβίωση, ή και τα δύο σε πολυπαραγοντική ανάλυση του σταδίου I ωοθηκικού καρκίνου.

Σε μια μεταγενέστερη μελέτη το [2011, The Cancer Genome Atlas \(TCGA\)](#) παρείχε την πρώτη ολοκληρωμένη μοριακή ταξινόμηση μιας μεγάλης ομάδας με υψηλή ποιότητα ορού με ωοθηκικό καρκίνο και ολοκληρωμένες αναλύσεις των πολυδιάστατων δεδομένων, συμπεριλαμβανομένων των προφίλ έκφρασης των miRNA, ώστε να προσδιορίσει μοριακά τις ανωμαλίες που επηρεάζουν την παθοφυσιολογία του ωοθηκικού καρκίνου, που επηρεάζουν το αποτέλεσμα, και αποτελούν θεραπευτικό στόχο.

Η [Transcriptomic analyses](#) προσδιόρισε τέσσερους μοριακούς υποτύπους του καρκίνου των ωοθηκών, που δεν συνδέονται σημαντικά με την επιβίωση, ονομάστηκαν ανοσολογικά, διαφοροποιημένα, πολλαπλασιαστικά και μεσεγχυματικά με βάση τον

εμπλουτισμό των συγκεκριμένων γονιδίων στον υπότυπο. Η έκφραση των miRNA διαφοροποιούν τα καρκινικά δείγματα σε τρεις βασικούς υποτύπους όπου τα miRNA υποτύπου 1 επικαλύπτονται με τον υπότυπο των πολλαπλασιαστικών mRNA και τα miRNA υποτύπου 2-3 επικαλύπτονται με τον υπότυπο των μεσεγχυματικών mRNA. Ο υπότυπος 1 συνδέθηκε με τη χειρότερη επιβίωση των ασθενών σε σύγκριση με τους άλλους δύο υποτύπους.

Μια πρόσφατη επεξεργασία των δεδομένων TCGA έχει γίνει από τον Δρ Zhang εργαστήριο (Yang et al., 2013). Οι ερευνητές έδειξαν ότι η ολοκληρωμένη ανάλυση των μεταγραφικών miRNAs είναι σε θέση να ομαδοποιήσουν μεταγραφικά τους υποτύπους σε δύο κλινικές σχετικές υποκατηγορίες, ένα με μεσεγχυματικά και ένα με επιθηλιακά κύτταρα. Οι αναλύσεις υπογραμμίζουν τον σημαντικό ρόλο του ρυθμιστικού δικτύου των miRNA που αποτελούνται από οκτώ βασικά miRNAs για τον υπότυπο με τα μεσεγχυματικά συμπεριλαμβανομένων των miR-141 και miR-200, το miR-29c, miR-101, το miR-506 και του miR-128.

**Πίνακας 2: Μελέτες με το προφίλ των miRNA σε επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών.**

Reference	Number of samples/subtypes	Method of analyses	Main findings
Iorio et al. (2007)	15 Normals/69 tumors 31 Serous/8 endometrioid/4 clear cells/9 poorly differentiated/1 mucinous	miRNA microarray	Ovarian cancer-specific miRNA signature Subtypes specific miRNA signature Epigenetic mechanism responsible for their aberrant expression
Yang et al. (2008a)	10 Tumors and 10 "normal" HIOSE cell line	miRNA microarray	Ovarian cancer-specific miRNA signature miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance through targeting PTEN
Laios et al. (2008)	3 Primary serous/3 recurrent serous tumors	qRT-PCR	miR-9 and miR-223 can be biomarkers in recurrent ovarian cancer
Nam et al. (2008)	22 Serous tumors/8 normals	miRNA microarray	Ovarian cancer-specific miRNA signature
Zhang et al. (2008)	106 Tumors 109 Tumors 76 Tumors 504 Tumors 96 Tumors	miRNA microarray, aCGH, affymetrix cDNA microarray, tissue array, qPCR validation	miRNAs are downregulated in malignant transformation and tumor progression Genomic copy number loss and epigenetic silencing account for miRNA dysregulation
Dahiya et al. (2008)	34 Tumors and HOSE-B cell line	miRNA microarray	Ovarian cancer-specific miRNA signature
Sorrentino et al. (2008)	Drug-resistant vs. wild-type cancer cell lines	miRNA microarray	Paclitaxel and cisplatin resistance is associated with a specific miRNA fingerprint
Yang et al. (2008b)	69 Tumors (42 sensitive/27 resistant)	miRNA microarray	Let-7i is a modulator of platinum-based chemotherapy Let-7i is a biomarker to predict chemotherapy response and survival
Boren et al. (2009)	16 Ovarian cancer cell lines	miRNA microarray	miRNA signature associates to cell line drug response
Wyman et al. (2009)	33 Tumors/HOSE-B cell line	Deep sequencing	Ovarian cancer-specific miRNA signature Subtypes specific miRNA signature
Eitan et al. (2009)	19 Tumors (stage I)/38 tumors (stage III)	miRNA microarray	miRNA signature during progression miRNA expression associated with response to platinum-chemotherapy
Hu et al. (2009)	55 Advanced-stage tumors	miRNA microarray	miR-200b-429 are biomarkers for ovarian cancer outcome
Lee et al. (2009)	33 High-grade serous tumors 2 Low-grade serous tumors 2 Serous borderline tumors 3 Normal fallopian tubes	miRNA microarray	No abnormalities in miRNA expression correlated to BRCA1/2 status miR-34c and miR-422b are prognostic biomarkers
Nagaraja et al. (2010)	10 Human clear-cell ovarian cancer cell lines and 1 normal ovarian surface epithelial cultures	Deep sequencing	Clear-cell ovarian cancer-specific miRNA signature miR-101 inhibits mTOR pathway and increases rapamycin sensitivity
Creighton et al. (2010)	8 Serous tumors 4 Serous cancer cell lines 4 NOSE cell lines	Deep sequencing	miR-31 is downregulated in cancer Reduced levels of miR-31 are correlated with defects in the p53 pathway
Vaksman et al. (2011)	21 Tumors (13 effusions/ 8 primary tumors)	miRNA microarray	miRNA signatures for the primary tumors and effusions
Kim et al. (2010)	103 Tumors	miRNA microarray	miRNA signature is correlated with clinico-pathological parameters (subtype, grade, survival)
Marchini et al. (2011)	144 Tumors (stage I)	miRNA microarray	Ovarian cancer-specific miRNA signature miR-200c is a predictor of survival and relapse
Cancer Genome Atlas Research Network (2011)	489 Serous tumors	miRNA microarray	Global analyses of mRNA expression, miRNA expression, promoter methylation, and DNA copy number



Επειδή η πλειονότητα των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, έχουν διαγνωστεί σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, η ταυτοποίηση των πρώιμων όγκων είναι απαραίτητη για τη βελτίωση της πρόγνωσης και της θεραπείας. Ένας από τους καλύτερους τρόπους για την έγκαιρη διάγνωση είναι η προγνωστική βοήθεια και η πρόβλεψη στη θεραπευτική απόκριση όπου χρησιμοποιούν διαγνωστικά ή προγνωστικά τον ορό και βιοδείκτες ιστού. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν πολλοί αξιόπιστοι βιοδείκτες απο ορό για τον καρκίνο των ωοθηκών, που να χρησιμοποιούνται σήμερα κλινικά, βασίζονται στους δείκτες των ιστών και απαιτείται επεμβατική διαδικασία για την απόκτηση δειγμάτων. Ως εκ τούτου, γίνονται νέες προσπάθειες για τον εντοπισμό νέων δεικτών από ορό που θα βοηθήσουν στην διαδικασία επιλογής δείγματος. Η ικανότητα των κυκλοφορούντων miRNAs έχει δείξει μια μη επεμβατική ευκαιρία να εντοπισθούν πολλές υποσχόμενες εναλλακτικές προσεγγίσεις για τις τρέχουσες στρατηγικές για την επιτήρηση των ωοθηκών, του καρκίνου και την έγκαιρη διάγνωση.

Σε αυτό το πλαίσιο, με τη χρήση δειγμάτων ορού από ασθενείς με διάφορα στάδια του καρκίνου των ωοθηκών, οι Taylor και Gercel-Taylor (2008) έδειξαν ότι το 46% των miRNAs εξωσωμάτων (exosomes) ήταν τα ίδια όπως εκείνα των πρωτογενών όγκων. Δώδεκα miRNAs ήταν παρόν με υψηλό ποσοστό σε κακοήγη κύτταρα (ES: mir-155, -29), ενώ 31 ήταν παρόν με αυξημένα επίπεδα αποκλειστικά σε εξωσώματα (ES: miR-203, -205). Η μελέτη προσδιόρισε 23 miRNAs που εκφράζονται διαφορετικά σε ορό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, μόνο 10 από αυτά τα miRNAs ήταν κοινά με τα miRNAs που έχουν προηγουμένως δημοσιευθεί στη βιβλιογραφία ως μέρος του καρκίνου των ωοθηκών (συμπεριλαμβανομένων του mir-21) (Resnick et al., 2009).

Σε μια άλλη μελέτη, τα επίπεδα των τεσσάρων miRNAs (mir-200a, b, c, και miR-182) ταυτοποιήθηκαν ως προς τη διαφορετική έκφρασή τους σε ορό από 28 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών και υγιείς εθελοντές αντίστοιχης ηλικίας (Kan et al., 2012). Το miR-200C ήταν διαφορετικά εκφρασμένο και ένας συνδιασμός των miR-200b και miR-200c έδωσε την καλύτερη προβλεπτική ικανότητα για ορό ωοθηκικού καρκίνου.

Μια διαφορετική προσέγγιση, αντιλήφθει από Vaksman et al. (2011), ο οποίος ανέλυσε το προφίλ έκφρασης των miRNA των πρωτογενών καρκίνων των ωοθηκών και συλλογών από ασθενείς με νόσο που εξαπλώθηκε πέρα από την ωοθήκη, προκειμένου να καθοριστεί μια νέα παράμετρος για τη μεταστατική διάδοση. Οι ερευνητές προσδιόρισαν τρεις ομάδες miRNAs:

- a) που εκφράζονται υψηλά σε πρωτογενή καρκίνο των ωοθηκών και με διαχύσεις
- b) που υπερεκφράζονται μόνο σε πρωτοπαθή καρκίνο των ωοθηκών και
- c) που υπερεκφράζονται μόνο σε σύνολα.

Τα miR-210, -182, και -99a υπερεκφράζονται σημαντικά σε συλλογές σε σύγκριση με τους πρωτοπαθείς όγκους, ενώ το hsa-miR-145 ήταν σημαντικά υπερεκφραζόμενο σε αδενοκαρκινώματα. Συνολικά, οι παραπάνω μελέτες παρείχαν χρήσιμες πληροφορίες βιοδεικτών για καρκίνο των ωοθηκών. Η μεγάλη ετερογένεια των αποτελεσμάτων, με βάση τις διαφορές στα δείγματα που αναλύθηκαν και την τεχνολογία που εφαρμόστηκε, τονίζει ότι οι πρόσθετες μελέτες για να καθορίσουν την έξυπνη και αξιόπιστη αποτύπωση των miRNA μπορεί να βρουν μια κλινικο-παθολογική εφαρμογή (7)

### 4.3 Η έκφραση των miRNA στον καρκίνο των ωοθηκών

Η πρώτη πρωτοποριακή μελέτη που επικεντρώθηκε στο εξώσωμα (exosome) των microRNAs στον ορό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών έχει δημοσιευθεί το 2008. Η μελέτη έδειξε συσχέτιση της έκφρασης των microRNA μεταξύ καρκινικών ιστών και του κυκλοφορούντος EpCAM-θετικού εξωσωμικού όγκου, αδυνατώντας παράλληλα να βρουν την έκφρασή του σε δείγματα μαρτύρων. Ακολουθούμενες μελέτες, επικεντρώθηκαν σε microRNAs που απομονώθηκαν με διάφορα μέσα από άλλους τύπους καρκίνου. Πηγαίνοντας πίσω στον καρκίνο των ωοθηκών, Resnick et al.(2009) ανέλυσε την έκφραση των microRNA στον ορό των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Βρέθηκαν τα miRNAs-21, 92, 93, 126 και 29a όπου σημαντικά υπερεκφράζονται, και τα miRNAs-155, 127 και 99b που σημαντικά υπο-εκφράζονται κατά τη σύγκριση των ορών με καρκίνο με αυτά των μαρτύρων.

Σε αντιστοιχία με την ογκογόνο κατάσταση και την υπερ-έκφραση του miR-21 που βρέθηκε νωρίτερα σε καρκινικούς ιστούς των ωοθηκών, ερευνήθηκαν τα επίπεδα ορού από αυτά τα miRNA. Εδώ, Xu et al.(2013) βρήκε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-21 σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών που συνδέονται επίσης με προχωρημένο FIGO στάδιου της νόσου, υψηλού βαθμού όγκοι και μειωμένη τη συνολική επιβίωση αυτών.

Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι το miR-92 μπορεί να βρεθεί ρυθμισμένο στον ορό των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Σε αυτή τη μελέτη, καταχωρήθηκαν 50 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών και 50 μάρτυρες, όπου το miR-16 χρησιμοποιήθηκε στον εσωτερικό έλεγχο. Η αυξημένη έκφραση του miR-92a συνδέθηκε με την συμμετοχή των περιφερειακών λεμφαδένων σε προηγμένα κλινικά στάδια (III-IV).

Μια μεγάλη πρόσφατη μελέτη διερεύνησε την έκφραση των microRNA σε δείγματα πλάσματος από ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών (360 ασθενείς EOC, 200 υγιείς μάρτυρες). Η μελέτη αποκάλυψε υψηλά επίπεδα έκφρασης των miR-205 και

χαμηλά επίπεδα έκφρασης του let-7f σε δείγματα καρκίνου σε σχέση με τους μάρτυρες, η χαμηλή έκφραση του let-7f οφειλόταν στη φτωχή πρόγνωση των ασθενών EOC . Σε σύγκριση του πρώιμου και του αυξημένου σταδίου, η έκφραση του miR-483-5p ήταν αυξημένη στα στάδια III και IV . Ως προς τη μειωμένη ρύθμιση της έκφρασης των microRNA στον ορό των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών (18 οροί καρκινοπαθών, 12 μάρτυρες) έδειξαν πιο έντονα και σημαντικά τα miR-132, miR-26a, let-7b, miR-145 και miR-143, στη μελέτη των Chung et al.(2013) Σε μια άλλη έρευνα αναλύθηκε διακριτά η αποτύπωση microRNA σε πλάσμα ασθενών με ενδομητρίωση, ενδομητρίωση σχετιζόμενη με καρκίνο των ωοθηκών (EAOC) και υγιών ασθενών ως μάρτυρες. Είναι ενδιαφέρον, τα δύο microRNAs που σχετίζονται με την ενδομητρίωση και EAOC, αντίστοιχα, βρέθηκαν να απορυθμίζονται σημαντικά σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, είχαν δείξει να υπερεκφράζονται τα (miR-21, miR-191, το miR-16, miR-15b, miR-1977 , miR-1979, miR-1973, miR-1974, miR-4284, και του miR-195)

Μια πολύ πρόσφατη μελέτη έδειξε μια συνδυασμένη προσέγγιση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία βαθιάς αλληλούχισης (Solexa) και τη real time PCR για microRNA αναλύσεις σε ορό ασθενών με καρκίνων των ωοθηκών. Αυτή η έρευνα περιείχε 31 ασθενείς με ωοθηκικό καρκίνωμα, 23 ασθενείς σε πρώιμο στάδιο ωοθηκικών όγκων, και 8 μάρτυρες που επιβεβαίωναν τη διαφορετική έκφραση των τεσσάρων microRNAs. Τα miR-22 και miR-93 φάνηκαν να είναι σταθερά υπερεκφραζόμενα ( >2 φορές) καθώς και το miR-451 σε καρκινικές σειρές. Από την άλλη πλευρά, το miR-106b εμφάνισε σημαντικά μειωμένη έκφραση σε καρκινικά δείγματα . Άλλη έρευνα για την εύρεση σχετικών διαγνωστικών ορών με τα κυκλοφορούντα microRNAs δημοσιεύτηκε πρόσφατα. Υπήρχαν 42 δείγματα ορών επιθηλιακών καρκίνων, 36 αρχικού σταδίου και 23 μάρτυρες ασθενών εγγραφόμενοι στη παρούσα έρευνα. Τα microRNAs με μειωμένη έκφραση σε καρκινικά δείγματα σε σύγκριση με αυτά των μαρτύρων έδειξε να είναι τα: miR-106a, miR-126, το miR-146a, miR-150, το miR-16, miR-17, miR-19 b, miR-20a, miR-223, το miR-24, και του miR-92a. Μειωμένη έκφραση, παρατηρήθηκε επίσης στα miR-106 b, miR-191, miR-193a-5P, miR-30b, miR-5P 30a-, miR-30c, miR-320 και του miR-328.

Τρία μόνο MicroRNAs , miR-1274a, miR-625-3p, και miR-720 υπερεκφράζονταν σε καρκινικά δείγματα αλλά αυτό δεν έδειξε να υπάρχει καλή διευκρίνιση ανάμεσα στα δείγματα καρκίνου και στους μάρτυρες. Κατά τη σύγκριση των προαναφερθέντων ερευνών, ακριβή αποτελέσματα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ιδιαίτερα σημαντικά για το ογκογονίδιο miR-21. Το miR-21 έχει βρεθεί να έχει αυξημένη έκφραση σε αρκετές μελέτες. Αμφιλεγόμενα αποτελέσματα υπάρχουν για το

miR-92a, που φαίνεται ως επί το πλείστον το πιο υπερεκφραζόμενο, αλλά και ως υποεκφραζόμενο σε άλλα δείγματα καρκίνου. (7)

Λεπτομέρειες σχετικά με την έκφραση microRNA ορού / πλάσματος στον καρκίνο των ωοθηκών βλέπετε στο Πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Λίστες έκφρασης των microRNAs που βρέθηκαν σε καρκίνους των ωοθηκών σε δείγματα αίματος, πλάσμα / ορό και στα ούρα.

Type of cancer	Detailed specification	Up-regulated microRNAs	Down-regulated microRNAs	Sample source	Methodology	Reference
<b>Ovarian carcinoma</b>	Relapsed ovarian cancer:serous (n = 22), endometrioid (n = 2).Control samples (n = 15)	miR-16, miR-30c-1*,miR-187, miR-191,miR383, miR-423-3p, miR-499-3p, miR-574-5p, miR-1181, miR-1228, miR-1253, miR-1254, miR-1289, miR-1908, miR-1915	miR-28-3p, miR-29a, miR-106b, miR-138-2*, miR-146a, miR-155, miR-181a*, miR-181a-2*, miR-192, miR-342-3p, miR-450-5p, miR-616*, miR-628-5p, miR-1287, let-7f-1*	Whole blood	Geniom Biochip miRNA homo sapiens array	(8)
<b>Ovarian carcinoma</b>	Serous carcinomas(n = 50),benign samples (n = 10), control samples (n = 10)	miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205,miR-214		EpCAM-positive tumor exosomes in blood	Ocean Ridge Biosciences microarrays, GenePix 4000A	(9)
<b>Ovarian carcinoma</b>	EOC (n = 28), serous ,(60%), clear cell (21.2%), endometrioid (12%), mucinous (6%).Control samples (n = 15).	miR-21, miR-29a, miR- 92, miR-93, miR-126	miR-99b, miR-127, miR- 155	Blood serum	TaqMan Array Human MicroRNA Panel, single tube TaqMan MicroRNA Assays	(10)
<b>Ovarian carcinoma</b>	Serous carcinomas (n = 68), others (n = 26). Control samples (n = 40).	miR-21	n/a	Blood serum	TaqMan microRNA assay	(11)
<b>Ovarian carcinoma</b>	EOC samples (non-specific) (n = 50). Control samples (n = 50).	miR-92		Blood serum	SYBR green qRT- PCR	(12)
<b>Ovarian</b>	Total EOC cases (n =	miR-205	let-7f	Blood plasma	TaqMan	(13)

<b>carcinoma</b>	360), incl. 179 serous tumors (49.7%), 86 endometrioid tumors (23.9%), 33 mucinous tumors (9.2%), 15 clear cell tumors (4.2%), and 47 adenocarcinomas, Not Otherwise Specified (NOS) (13.0%). Control samples (n = 200).				Array (TLDA)	
<b>Ovarian carcinoma</b>	Serous carcinomas (n = 18), control samples (n = 12).		miR-132, miR-26a, let-7b, miR-145, miR-143	Blood serum (filtration through a 0.2 µm filter)	Microarray Affymetrix miRNA2.0. TaqMan qRT-PCR	(14)
<b>Ovarian carcinoma</b>	Ovarian carcinomas (type unspecified) (n = 31), benign samples (n = 23). Control samples (n = 8).	miR-22 and miR-93	miR-106b	Blood serum	SYBR green qRT-PCR	(15)
<b>Ovarian carcinoma</b>	Serous carcinomas (n = 42), benign samples (n = 36). Control samples (n = 23).	miR-1274a, miR-625-3p, miR-720	miR-106a, - miR-126, miR-146a, miR-150, miR-16, miR-17, miR-19b, miR-20a, - miR-223, miR-24, miR-92a, miR-106b, miR-191, miR-193a-5p, miR-30b, miR-30a-5p, miR-30c, miR-320, and miR-328	Blood plasma (ultracentrifugation, plasma without exosomes)	Taqman Open Array MicroRNA	(16)
<b>Ovarian carcinoma</b>	Serous carcinomas (n = 28). Control samples (n = 28).	miR-200a, - miR-200b miR-200c		Blood serum	Exiqon MiRCURY Locked Nucleic Acid Arrays	(17)
<b>Ovarian carcinoma</b>	EOC, serous carcinomas (n = 5), others (n = 4), benign ovarian samples (n = 3). Control samples (n = 13).	miR-92a	miR-106b	Urine	Taqman microRNA real time PCR	(18)

#### 4.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ microRNAs ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Η αποτύπωση των microRNAs έχει δείξει τις δυνατότητές τους ως διαγνωστικό εργαλείο και την ικανότητα να προβλέψουν την κλινική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Το 2008, η ομάδα του Δρ Zhang προσδιόρισε τη συμμετοχή των let-7i στην ανταπόκριση της σισπλατίνης για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών (Yang et al., 2008b). Μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από το Eitan et al. (2009) ανέλυε τη συσχέτιση του miRNA στην ανταπόκριση της χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα σε ασθενείς σταδίου III. Συγκρίνοντας την έκφραση των miRNA ανάμεσα σε ασθενείς που κατόρθωσαν να ολοκληρώσουν επιτυχώς τη θεραπεία χωρίς υποτροπή εντός 6 μηνών από το τέλος και ασθενείς που υποτροπίασαν γρήγορα μετά τη θεραπεία, οι ερευνητές ανέφεραν επτά miRNAs που εκφράζονται διαφορετικά, συμπεριλαμβανομένων των hsa-miR-27a, 23a, miR-378. Η διαφορετική έκφραση αυτών των τριών miRNAs μεταξύ των ευαίσθητων και ανθεκτικών όγκων παρατηρήθηκε επίσης στο υποσύνολο των ασθενών σταδίου III που λάμβαναν τη συνδυασμένη αγωγή με πακλιταξέλη / καρβοπλατίνη.

Leskelä et al. (2010) απέδειξαν, αντιθέτως, ότι το miR-200c έδειξε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία με πακλιταξέλη-καρβοπλατίνη : οι γυναίκες που δεν ανταποκρίθηκαν στην αγωγή με πακλιταξέλη-καρβοπλατίνη είχαν όγκους με σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα miR-200c από εκείνες που είχαν την πλήρη ανταπόκριση. Επιπλέον, υψηλότερη έκφραση του miR-200c συσχετίστηκε με χαμηλότερα ποσοστά υποτροπής και εξέλιξης. Επί του παρόντος, η συνδυασμένη θεραπεία της καρβοπλατίνης / πακλιταξέλης έχει προσαρμοστεί ως η τυπική θεραπεία για γυναίκες με προχωρημένο επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών (EOC) (Hiro et al., 2010). Ωστόσο, πολλοί ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, που αρχικά ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία εμφάνισαν υποτροπή σε ανθεκτικά φάρμακα της νόσου. (Hassan et al., 2011).

Η ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία αποτελεί μείζον εμπόδιο για την επιτυχή θεραπεία του καρκίνου. Με βάση την συσχέτιση μεταξύ της φαρμακευτικής απόκρισης και της miRNA έκφρασης, πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να χειραγωγήσουν το μηχανισμό που ευθύνονται για τη χημειοανθεκτικότητα, μεταβάλλοντας τα επίπεδα των miRNAs. Prislei et al. (2013) έδειξε ότι η υπερέκφραση του miR-200c καταπιέζεται από την έκφραση της β-τουμπουλίνης (TUBB3) στο στάδιο III, ένας παράγοντας που σχετίζεται με αντίσταση στο φάρμακο και τη πτωχή πρόγνωση στον καρκίνο των ωοθηκών, και αυξάνει την ευαισθησία σε πακλιταξέλη και σισπλατίνη. Ίδια

αποτελέσματα ελήφθησαν επίσης από Cochrane et al. (2010), όπου έδειξαν ότι η αποκατάσταση του miR-200c αυξάνει την ευαισθησία των παραγόντων στόχευσης στους μικροσωληνίσκους και μετριάξει την εισβολή κατά 85%. Δύο άλλες μελέτες ανέφεραν ότι miR-182 και miR-125b έχουν αντοχή στη σισπλατίνη, ενδεχομένως η αντι-αποπτωτική τους δράση οφείλεται στην καταστολή των δύο σημαντικών καταστολέων όγκου, PDCD4 και Bcl-2 ανταγωνιστή killer 1 (Bak1), αντίστοιχα (Kong et al, 2011. Wang et al, 2013). (6)

## 5. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΗΤΡΑΣ - ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Ο καρκίνος του ενδομητρίου είναι ένας κοινός κακοήθης γυναικολογικός όγκος, αλλά υπάρχουν λίγοι βιοδείκτες που είναι χρήσιμοι για την έγκαιρη και ακριβή διάγνωση και λίγες θεραπείες πλην της χειρουργικής επέμβασης. Ωστόσο, η χρήση των microRNAs (miRNAs) που διεγείρουν το γονίδιο με μειωμένη έκφραση σε κύτταρα που μπορούν να επιτρέπουν την αποτελεσματική και ελάχιστα επεμβατική διάγνωση και θεραπεία. Σε καρκινικά κύτταρα ενδομητρίου, τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs συμπεριλαμβανομένων miR-185, miR-210 και miR-423 έχουν αυξημένη έκφραση καθώς τα miR-let7e, miR-30c και miR-221 έχουν μειωμένη έκφραση σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, αυτά τα miRNAs είναι που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, στην εισβολή και μετάσταση. Τα miRNAs που με την αλλαγή έκφρασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί βιοδείκτες είναι: miR-181β, miR-324-3p και miR-518b, η μετατροπή του miR-152 μπορεί να αναστέλλει την ανάπτυξη του καρκίνου (19).

### 5.1 Τα miRNA στο ενδομήτριο

Το ενδομήτριο είναι ένας ιστός που υφίσταται ουσιαστικές αλλαγές παράλληλα με τον εμμηνορροϊκό κύκλο στις γυναίκες. Αυτός ο ιστός αλλάζει για την εμφύτευση του ωαρίου και την ανάπτυξη του εμβρύου, οι ωοθήκες απελευθερώνουν τις ορμόνες του φύλου που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων. Οι αλλαγές αυτές ιστοπαθολογικά ταξινομούνται σε απόπτωση, ανάπτυξη των κυττάρων, νεοαγγείωση, διαφοροποίηση των κυττάρων και την αναδιαμόρφωση του ιστού. Οι αλλαγές μοιάζουν με μια φλεγμονώδη απόκριση και αλλαγές στις ενδοκρινείς και παρακρινείς δραστηριότητες του χημικού παράγοντα, που συμπεριλαμβάνουν τους παράγοντες ανάπτυξης όπως, χημειοκίνες, κυτοκίνες και πρωτεάσες, καθώς εμπλέκονται και μεταβολές στην εξωκυτταρική μήτρα. Η γρήγορη εναλλαγή του κυτταρικού κύκλου είναι ανεπιθύμητη στην πρόληψη της καρκινογένεσης. Ο εγγενής έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης με miRNAs είναι κρίσιμος σε αυτό το περιβάλλον και διάφορες αλλαγές στην έκφραση των miRNAs έχουν προταθεί στο ενδομήτριο, στην ενδομητρίωση ιστού, στη μητρορραγία και το καρκίνο του ενδομητρίου.

Pan et al(2011) διερεύνησε το προφίλ των miRNA στο διάμεσο της μήτρας και στο κοκκώδες επιθήλιο και διαπίστωσε ότι 32 miRNAs έδειξαν χαρακτηριστικά επίπεδα έκφρασης (20). Ειδικότερα, η οιστραδιόλη-17β και η προγεστερόνη ρυθμίζουν την



έκφραση των miR-20a, miR-21, miR-23, miR-26a, miR-18a, miR-181, το miR-206 και miR-142-5p. Αυτά τα miRNAs εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων με πολλές βασικές δράσεις στον ιστό της μήτρας, συμπεριλαμβανομένων του αυξητικού παράγοντα  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), TGF- $\beta$  υποδοχέα, του υποδοχέα οιστρογόνου, του υποδοχέα προγεστερόνης και CYP-19A1 (αρωματάσης). Ο αριθμός της φλεγμονής και της κυτταρικής ανάπτυξης που σχετίζονται με τους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του πυρηνικού παράγοντα κ-ελαφριάς αλυσίδας-ενίσχυσης των ενεργοποιημένων B κυττάρων (NP-κB), ρυθμίζονται επίσης από τα miRNAs σε τοπική φλεγμονή στον ιστό της μήτρας. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αναλυθεί η αναστολή της έκφρασης του παράγοντα νέκρωσης όγκων από το miR-125b και miR-155 (20).

## 5.2 Καρκίνος του ενδομητρίου και miRNA

Ο καρκίνος του ενδομητρίου είναι ο συχνότερος μεταξύ των κακοηθών καρκίνων των γυναικείων γενετικών οργάνων και περίπου το 80% των περιπτώσεων έχουν ιστολογικό τύπο του ενδομητριοειδούς αδеноκαρκινώματος (Amant et al., 2005). Ο ογκογόνος τύπος του καρκίνου του ενδομητρίου και οι παράγοντες για την μετάσταση και εισβολή έχουν τεκμηριωθεί καθώς και το πρότυπο έκφρασης των miRNAs διαφέρει από εκείνη των κανονικών του ενδομητρίου (Πίνακας 1). Μεταξύ των καρκίνων του ενδομητρίου, το ενδομητριοειδές καρκίνωμα και το θηλώδες καρκίνωμα έχουν επίσης διαφορετική έκφραση των miRNA (Chan et al., 2011). Στον καρκίνο του ενδομητρίου, στα miRNAs περιλαμβάνονται και τα miR-185, miR-106a, miR-181, miR-210, miR-423, miR-103, miR-107, miR-let7c, miR-205, miR-449 και miR-429 που έχουν αυξημένη έκφραση και συμμετέχουν στην ογκογένεση, σε εισβολή και μετάσταση (Boren κ.ά., 2008?. Wu et al, 2009?. Chung et al, 2009). Το miR-7 έχει επίσης αυξημένη έκφραση στο καρκίνο του ενδομητρίου, και η εισβολή και η μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων παρεμποδίζονται από τη μειωμένη ρύθμιση του miR-7 χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα αντι-miRNA (Chung et al., 2012). Στο ενδομητριοειδές αδеноκαρκίνωμα, η αυξημένη ρύθμιση του miR-27 είναι χειρουργικά στάδιοεξαρτώμενο. Το miR-27 συμβάλλει στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της παραγόμενης έκφρασης του FOXO1, ενός γονιδίου στόχου του miR-27 που αναστέλλει την απόπτωση (Mozos et al., 2014).

Dai et al. (2013) βρήκαν ότι το miR-200b υπερκφράζεται σε κυτταρικές σειρές αδеноκαρκινώματος και αναστέλλει την έκφραση του ιστού ως αναστολέας της μεταλλοπρωτεϊνάσης-2 (Timp2) και αυξάνει το επίπεδο των μεταλλοπρωτεϊνών της

μήτρας (MMP) 2, υποδεικνύοντας ότι το miR-200b εμπλέκεται στη μετάσταση του καρκίνου του ενδομητρίου. Έξι miRNAs δείχνουν συγκεκριμένα μοτίβα έκφρασης σε αδενοκαρκίνωμα, συμπεριλαμβανομένων του miR-34b, το οποίο μεθυλιώνεται στην περιοχή του υποκινητή σε αδενοκαρκίνωμα και εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό και την εισβολή (Hiroki et al., 2012).

Σε αντίθεση, πολλαπλά miRNAs συμπεριλαμβανομένων των miR-let7e, miR-30c, miR-221, miR-152, miR-193, miR-204, miR-99b και miR-193b είναι χαμηλής έκφρασης σε καρκίνο του ενδομητρίου (Boren et al. 2008, Wu et al. 2009, Chung et al. 2009). Αυτά τα miRNAs αναστέλλουν την ογκογένεση, την εισβολή και τη μετάσταση, και αυτό το φαινόμενο παράγεται από τη μειωμένη ρύθμιση των miRNAs. Τα miRNAs συμμετέχουν επίσης στη μεθυλίωση του DNA κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου του ενδομητρίου. Για παράδειγμα, εάν η έκφραση του miR-129-2 ενισχύεται από επιγενετικούς μηχανισμούς συμπεριλαμβανομένων της απομεθυλίωσης του DNA και την ακετυλίωση ιστονών, η έκφραση του SRY σχετίζεται με την υψηλής κινητικότητας ομάδα 4 (SOX4) που καταστέλλεται και αναστέλλεται η ανάπτυξη του καρκίνου του ενδομητρίου. Στον καρκίνο του ενδομητρίου, αυτός ο μηχανισμός αποτυγχάνει και το SOX4 υπερεκφράζεται (Huang et al., 2009).

Το miR-129-2 εμπλέκεται στην αστάθεια και μεθυλίωση του (hMLH1), ένα γονίδιο επιδιόρθωσης του DNA αναντιστοιχία (MMR) που εμπλέκεται στην εξέλιξη του καρκίνου του ενδομητρίου τύπου I. Το hMLH1 συχνά μεθυλιώνεται στους καρκινικούς ιστούς του ενδομητρίου και μπορεί να επάγει μετάλλαξη που σχετίζεται με καρκινικά γονίδια συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων (hMSH6), τύπου II trans σχηματισμού αυξητικού παράγοντα-βήτα (TGF-βII), το Bcl2 συνδέεται με τη X πρωτεΐνη (BAX) και PTEN (Banno et al., 2012). Εκτός από τα miR-129-2, miR-203 ρυθμίζουν επίσης το SOX4, και η μεθυλίωση αυτών των miRNAs μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη του καρκίνου του ενδομητρίου (Huang et al., 2014). Η έκφραση του miR-152 ρυθμίζεται από τη μεθυλίωση και ρυθμίζεται μειωτικά στο καρκίνο του ενδομητρίου.

Το miR-152 αναστέλλει την έκφραση των στόχων συμπεριλαμβανομένου του DNA μεθυλοτρανσφεράση (DNMT1), E2F3, στο ογκογονίδιο (MET) και (Rictor), τα οποία όλα εμπλέκονται στην ογκογένεση. Έτσι θεραπείες που στοχεύουν στη χρήση του miR-152 ως βιοδείκτη, έχουν δυνατότητες (Banno et al., 2012, Tsuruta et al 2011). Το miR-106b αναστέλλει τα EMT και TWIST1 (Dong et al., 2014) και η μετάσταση προωθεί τη μειωμένη ρύθμιση του miR-106b. Το let-7a αναστέλλει το Aurora-B και μειώνει το επίπεδο της πρωτεΐνης Aurora-B, με αποτέλεσμα την αναστολή της εμφάνισης του καρκίνου του ενδομητρίου (Liu et al., 2013). Το miR-204 ρυθμίζει επίσης τη μετάσταση και εισβολή των καρκινικών κυττάρων στο ενδομήτριο. Ο στόχος του miR-204,

(FOXC1), είναι να ρυθμίζει τη μετάσταση και εισβολή στο καρκίνο του ενδομητρίου που προέρχονται από τα κύτταρα HEC1A.

Στον καρκίνο του ενδομητρίου, το FOXC1 υπερεκφράζεται λόγω της μειωμένης ρύθμισης του miR-204 και αυτό προάγει τη μετάσταση και εισβολή των καρκινικών κυττάρων (Chung et al., 2012). Το miR-30c δρα άμεσα σε μεταστάσεις που σχετίζονται με το γονίδιο-1 (MTA1). Το miR-30c αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στο ενδομήτριο μέσω της ρύθμισης των MTA1, και έτσι η μειωμένη έκφραση του miR-30c μπορεί να εμπλέκεται στον καρκίνο του ενδομητρίου (Xie et al, 2011, Zhou et al, 2012). Το miR-30c είναι επίσης μειορυθμιζόμενο από την οιστραδιόλη (E2) στον υποδοχέα οιστρογόνου (ER), στα θετικά Ishikawa κύτταρα και στα ER-αρνητικά κύτταρα HEC1B, το οποίο υποδεικνύει ότι το οιστρογόνο ρυθμίζει το miR-30c στο ενδομήτριο και εμπλέκεται στην ογκογένεση του καρκίνου του ενδομητρίου (Kong et al., 2014).

Lin et al. (2008) έδειξαν ότι το miR-302 επάγει την απομεθυλίωση του συνολικού γονιδιωματικού DNA και συνεπώς, ενεργοποιεί τους παράγοντες της μεταγραφής, συμπεριλαμβανομένων των Oct4, Sox2, Nanog και Lin28. Η έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων σε ανθρώπινα κύτταρα ES προκαλεί τον επαναπρογραμματισμό σε αυτά τα κύτταρα, με τα σωματικά κύτταρα να αλλάζουν τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (mirPS). Το miR-302 αναστέλλει την ογκογένεση σε διάφορους καρκίνους, μεταξύ άλλων μέσω της άμεσης αναστολής της cyclinD1 και την έμμεση απαγόρευση της CDK1 (Yan et al., 2014). Πολλά σημαντικά ευρήματα έχουν περιγραφεί σε αυτή την ενότητα, αλλά είναι επίσης σαφές ότι η κατανόηση των μηχανισμών των miRNAs σε καρκίνο του ενδομητρίου απαιτεί περαιτέρω μελέτες (19).

### 5.3 Τα miRNA στο καρκίνο του ενδομητρίου

Boren et al(2011) βρήκαν ότι 13 miRNAs (HSA-α5-7θ, HSA-miR-221, HSA-miR-30c, HSA-miR-152, HSA-miR-193, HSA-miR-185, HSA-miR-106a, HSA-miR-181, HSA-miR-210, HSA-miR-423, HSA-miR-103, HSA-miR-107 και HSA-α5-7c) και 90 mRNA που προέρχονται από ανθρώπινο καρκίνο του ενδομητρίου και φυσιολογικούς ιστούς της μήτρας που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου του ενδομητρίου, και πρότεινε ότι τα 13 miRNAs είναι αναγνωρισμένα 26 (29%) των mRNA 90 ως στόχοι. Συνολικά, 11 από αυτά τα 26 γονίδια mRNA (KCNMB1, IGFBP-6, ENPP2, TBL1X, CNN1, MYH11, KLF2, TGFB1 / 1, MYL9, SNCAIP και RAMP1) έδειξαν να σχηματίσουν ένα δίκτυο και να συμμετάσχουν στην ανάπτυξη των κυττάρων (21).

Πίνακας 4: Καρκίνοι του ενδομητρίου που σχετίζονται με miRNAs.

Up-regulated	Down-regulated	Reference
miR-185	miR-Let7e	Boren <i>et al</i> (21)
miR-106a	miR-221	Wu <i>et al</i> (22)
miR-181a	miR-30c	Chung <i>et al</i> (23)
miR-210	miR-152	
miR-423	miR-193	
miR-103	miR-204	
miR-107	miR-99b	
miR-Let7c	miR-193b	
miR-205		
miR-449		
miR-429		

Myatt et al(2010) διαπίστωσε ότι η έκφραση του γονιδίου καταστολέα του όγκου FOXO1 σε καρκινικά κύτταρα του ενδομητρίου έχουν μειωμένη έκφραση σε σύγκριση με εκείνη στο κανονικό ενδομήτριο (24).Οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι το επίπεδο του FOXO1 ήταν υψηλότερο στο κανονικό ενδομήτριο, χαμηλότερο σε υπερπλασία του ενδομητρίου και περαιτέρω μειωμένο σε όγκο ενδομητρίου. Ωστόσο, το επίπεδο του FOXO1 είναι σχετικά υψηλό σε HEC-1B κύτταρα καρκίνου του ενδομητρίου και χαμηλότερο σε Ishikawa κύτταρα καρκίνου του ενδομητρίου. Στα κύτταρα HEC-1B, τα επίπεδα έκφρασης των miR-9, miR-27, miR-96, miR-153, το miR-182, το miR-183 και του miR-186 ήταν υψηλά, ενώ βρέθηκε μειωμένη έκφραση στα miR-29a, miR-128 , miR-152 και του miR-486. Ως εκ τούτου, αυτό το μοντέλο έκφρασης των miRNA φαίνεται να παράγεται με περιορισμένη αναστολή της έκφραση του FOXO1. Σε κύτταρα Ishikawa, τα επίπεδα έκφρασης των miR-27, miR-96, miR-128, το miR-153, το miR-182, το miR-183 και του miR-186 ήταν υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα στα κύτταρα HEC-1B, το οποίο μπορεί να αντανάκλα το χαμηλότερο επίπεδο FOXO1 στα κύτταρα Ishikawa σε σύγκριση με τα κύτταρα HEC-1B. Επιπλέον, στα κύτταρα Ishikawa, η αναστολή της έκφρασης των miR-9, miR-27, miR-96, miR-153, το miR-183 και του miR-186 που προκαλείται από το FOXO1 εξαρτάται από την αναστολή του κυτταρικού κύκλου G1 και το κυτταρικό θάνατο με σταδιακή μείωση του RNAi με την έκφραση του FOXO1. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το miRNA εξαρτάται

από το FOXO1 και λόγω της μειωμένης έκφρασης διαδραματίζει βασικό ρόλο στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στο ενδομήτριο.

Myatt et al(2010) συμπέρανε ότι η ανώμαλη έκφραση των miRNAs επηρεάζει τη ρύθμιση της απόπτωσης που σχετίζεται με τα γονίδια και παίζουν ένα συγκεκριμένο ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του ενδομητρίου (24). Η μελέτη αυτή είναι αξιοσημείωτη, καθώς έδειξε ότι τα miRNAs σε ένα δίκτυο γονιδίων που αναπτύχθηκε στο silico ανέστειλε τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και αυτά που προκαλούσαν την ογκογένεση. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι το μέγεθος του όγκου μειώθηκε κατά την αναστολή αυτών των miRNAs, γεγονός που υποδηλώνει το δυναμικό της στόχευσης των miRNAs ως θεραπευτική στρατηγική σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου. Hiroki et al(2011) πραγματοποίησε μια συγκριτική μελέτη του καρκίνου του ενδομητρίου και κανονικών ιστών που προέρχονται από 21 ασθενείς με ορώδη αδενοκαρκινώματα του ενδομητρίου μεταξύ Ιανουάριο 2001 και Δεκέμβριο 2006 και ανέλυσε τη σχέση των επιπέδων των miRNA με τις κλινικές εκβάσεις, συμπεριλαμβανομένων των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών και το ποσοστό επιβίωσης τους (25).

Από τα 120 miRNAs που αναλύθηκαν, τα επίπεδα έκφρασης των 54, συμπεριλαμβανομένων των miR-101, το miR-10b \*, miR-152 και miR-29b, είχαν μειωμένη έκφραση, και τα υπόλοιπα 66, συμπεριλαμβανομένων των miR-200a, miR - 200b και miR-205, είχαν αυξημένη έκφραση. Η χαμηλή έκφραση των miR-101, miR-10b \*, miR-139-5p, miR-152, miR-29b και miR-455-5p ήταν ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για τη συνολικά κακή επιβίωση ( $p < 0.05$ ) και η χαμηλή έκφραση των miR-152, miR-29b και miR-455-5p ήταν ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για την κακή επιβίωση της νόσου ( $p < 0,05$ ).

Αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής αυτής ανάλυσης ανέδειξε ότι η χαμηλή έκφραση του miR-152 ήταν ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την κακή συνολική επιβίωση ( $p = 0,021$ ), και η χαμηλή έκφραση του miR-101 και του miR-152, ήταν ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την κακή επιβίωση της ασθένειας ( $P = 0,016$  και  $P = 0.010$ , αντίστοιχα). In vitro μελέτες έδειξαν ότι η επιμόλυνση με miR-101 και με miR-152 ανέστειλαν την ανάπτυξη των κυττάρων σε ορώδη ενδομητρικό αδενοκαρκίνωμα ( $P < 0,0001$  και  $p < 0.01$ , αντίστοιχα), και μια ισχυρή θετική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ του miR-101 με μειωμένη έκφραση και την ανοσοαπόκριση σε κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2) ( $P = 0,035$ ).

Hiroki et al.(2011) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα στοιχεία αυτά έδειξαν ότι η ανεπαρκής ρύθμιση της έκφρασης των miRNAs ήταν ένας αποτελεσματικός δείκτης για την πρόβλεψη της κακής πρόγνωσης σε ασθενείς με ορώδη αδενοκαρκίνωμα του

ενδομητρίου (25). Η μελέτη αυτή είναι ζωτικής σημασίας, δεδομένου ότι δείχνει μια πραγματική σχέση μεταξύ της πρόγνωσης και των επιπέδων των miRNA στον καρκίνο του ενδομητρίου.

Chung et al(2009) (23) διερεύνησαν την έκφραση των miRNA και τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του καρκίνου του ενδομητρίου σε 30 δείγματα που συλλέχθηκαν από ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου ενδομητριοειδές στο Χονγκ Κονγκ. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με 22 δείγματα φυσιολογικού ιστού. Καρκίνωμα ανιχνεύθηκε σε 25 δείγματα των σταδίων I και II, και 5 του σταδίου III. Βρέθηκαν υψηλά επίπεδα των miR-95, miR-103, miR-106a, miR-151, το miR-155, το miR-182, το miR-183, το miR-194, το miR-200a, miR-200c, miR-203, το miR-205, miR-210 και του miR-223. Ένα σύνολο από 30 miRNAs σχετίστηκαν με τα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την πρόγνωση, συμπεριλαμβανομένης της περιόδου της νόσου, την εισβολή σε μυϊκά στρώματα, την υποτροπή και την εισβολή των λεμφαδένων. Ένα σύνολο 68 γονιδίων ταυτοποιήθηκαν ως δυνητικοί στόχοι των 30 miRNAs.

Chung et al (23) σημείωσε ότι το επίπεδο έκφρασης του miR-205 σε καρκινικό ιστό ήταν εξαιρετικά υψηλό, σε 27,2 φορές απ'ότι στους φυσιολογικούς ιστούς. Chung et al έδειξε ότι η επιμόλυνση των ακολούθων αναστολής του miR-205 εντός της κυτταρικής σειράς του καρκίνου του ενδομήτριου όπου το RL95-2 ανέστειλε την έκφραση του miR-205 κατά 64,9% και αύξησε την έκφραση του γονιδίου καταστολής του όγκου κατά 14,2% του JPH4 (23). Το JPH4 δείχνει ανωμαλίες σε ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα και τα in vitro και in vivo αποτελέσματα δείχνουν ότι είναι ένας στόχος του miR-205. Τα αποτελέσματα του Chung et al είναι σημαντικά επειδή δείχνουν τη σχέση μεταξύ των επιπέδων miRNA και τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά στο ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα, το οποίο αντιπροσωπεύει το 80-90% του καρκίνου του ενδομητρίου.

**Πίνακας 5 : Λίστα έκφρασης των microRNAs που βρέθηκαν σε καρκίνο του ενδομητρίου σε δείγματα αίματος, πλάσμα / ορό και στα ούρα.**

Type of cancer	Detailed specification	Up-regulated microRNAs	Down-regulated microRNAs	Sample source	Methodology	Reference
<b>Endometrial carcinoma</b>	Endometrioid endometrial cancers (n = 48), control samples (n = 14)	miR-99a, miR-100, miR-199b		Blood plasma	ViiA7 Real-Time PCR System	(26)
<b>Endometrial carcinoma</b>	Endometrioid endometrial cancers (n = 34). Control samples (n = 14).	miR-92a, miR-141, miR-200a, miR-203, miR-449a, miR-1228 and miR-1290	miR-9, miR-301b	Blood plasma	ViiA7 Real-Time PCR System	(27)
<b>Endometrial carcinoma</b>	Endometrioid endometrial cancers (n = 33). Control samples (n = 42).	miR-222, miR-223, miR-186, miR-204		Blood serum	TaqMan array human microRNA A+B cards set v3.0 real time PCR	(28)
<b>Endometrial carcinoma</b>	Endometrioid endometrial cancers (n = 9), benign endometrial samples (n = 3). Control samples (n = 13).		miR-106b	Urine	Urine Taqman microRNA real time PCR	(29)

## 5.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ microRNAs ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

**Η** έκφραση των miRNA σε ιστούς ρυθμίζεται από τον αριθμό των miRNAs που υπάρχουν σε ένα κύτταρο σε μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Η ιστοειδική έκφραση των miRNA έχει επίσης αποδειχθεί με ανάλυση αυτών των προτύπων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τον εντοπισμό της αρχικής πηγής ενός καρκίνου, το οποίο είναι σημαντικό για τη θεραπεία. Η ανάλυση των miRNA μπορεί επίσης να είναι χρήσιμη για τη διάκριση της πρωτογενούς βλάβης από μεταστάσεις.

Η έκφραση των miRNA μπορεί να χρησιμεύσει ως προγνωστικός δείκτης, δεδομένου ότι η πρόγνωση του καρκίνου συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης των πολυάριθμων miRNAs: let-7, let-7a-2 και miR-155 στον καρκίνο του πνεύμονα, το miR-125b-στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, το miR-21 στη μήτρα, στο γαστρικό, του παχέως εντέρου και του παγκρέατος, και το let-7b και miR-205 στο κεφάλι και το λαιμό, και το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα. Αυτές οι συσχετίσεις είναι καθαρά στατιστική και οι θεμελιώδεις υποκείμενοι μηχανισμοί έχουν διευκρινιστεί. Μια μελέτη έδειξε ότι η μεθυλίωση του let-7a-3 συνδεόταν με πρόγνωση στον καρκίνο των ωοθηκών. Κακή έκβαση βρέθηκε σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών με χαμηλά επίπεδα των mRNA για Dicer και Drosha, τα οποία εμπλέκονται στην ωρίμανση των miRNAs. Αν το πρόδρομο miRNA δεν έχει αποτελεσματική επεξεργασία, το τελικό μόριο miRNA που προκαλείται από το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης δεν μπορεί να λειτουργήσει ικανοποιητικά, με αποτέλεσμα την ανώμαλη ογκογόνο επίδραση. Ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα με χαμηλά επίπεδα έκφρασης της Dicer έχουν επίσης κακή πρόγνωση (30).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν διεξαχθεί στη σχέση μεταξύ miRNA και αντίστασης φαρμάκου σε καρκινικά κύτταρα. Meng et al(2006) έδειξε ότι η ευαισθησία σε γεμισταβίνη αυξήθηκε με αναστολή του miR-21 και miR-200b, τα οποία έχουν μια υψηλότερη έκφραση στον καρκίνο του χοληδόχου πόρου σε σχέση με καλοήθεις όγκους (31).

Yang et al(2008) έδειξαν ότι miR-21 εισάγεται σε καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών ενεργοποιημένα AKT μέσω αναστολής PTEN και επιδεινώθηκε με αντίσταση στη σισπλατίνη (32). Η σχέση των miRNAs με την ευαισθησία στη δοξορουβικίνη σε καρκίνο του μαστού και την ευαισθησία στην ενδοκρινική θεραπεία έχουν επίσης εξεταστεί. Περαιτέρω μελέτες για την ανθεκτικότητα σε πολλά φάρμακα μπορούν να



διευκολύνουν την επιλογή των θεραπευτικών στρατηγικών με βάση τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs.

Το RNA διασπάται από την RNase στον ορό, που αρχικά πίστευαν ότι τα miRNAs θα απουσίαζαν. Ωστόσο, ένας αριθμός των miRNAs, συμπεριλαμβανομένων του miR-638, ανιχνεύθηκαν στη συνέχεια στον ορό. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα miRNAs απελευθερώνονται εντός και σταθεροποιούνται στον ορό δεν έχει ακόμη καθοριστεί, αλλά τα miRNAs φαίνεται να μεταφέρονται επιλεκτικά και να βασίζονται σε συγκεκριμένες απαιτήσεις για τα μόρια στον ορό. Lawrie κ.ά.(2008) ανέφερε μια συσχέτιση μεταξύ του miR-21 και την πρόγνωση των ασθενών με διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα (33) και Mitchell et al(2008) βρήκε υψηλά επίπεδα στον ορό το miR-141 σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (34)

Tanaka et al(2009) βρήκαν ότι στον ορό των ασθενών με οξεία λευχαιμία περιλαμβάνονται περισσότερα miRNAs με χαμηλά επίπεδα έκφρασης από ό, τι σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση με ορό υγιών εθελοντών. Ειδικότερα, το επίπεδο ορού του miR-92 μειώθηκε σημαντικά, ενώ το επίπεδο του miR-92 σε κύτταρα με λευχαιμία ήταν υψηλό (35). Για να εξηγήσει αυτά τα αποτελέσματα, Tanaka et al(2009) πρότειναν την υπόθεση ότι τα κύτταρα λευχαιμίας αποδομούν συγκεκριμένα miRNAs ή προωθούν την πρόσληψη του miR-92 από το αίμα (35). Ο συσχετισμός μεταξύ ενός συγκεκριμένου καρκίνου και του επιπέδου miRNA ορού υποδεικνύει την σκοπιμότητα για διαγνωστικές και προγνωστικές προβλέψεις με βάση τα επίπεδα miRNA στο αίμα. Αυτό είναι πιθανό να γίνει ένα βασικό τομέα της έρευνας, δεδομένου ότι τα miRNAs ως βιοδείκτες μπορεί να επιτρέψουν την έγκαιρη διάγνωση, την εξατομικευμένη αντιμετώπιση και τη προγνωστική πρόβλεψη.

Μένει να διευκρινιστεί αν επιμολυσμένα miRNAs έχουν ισοδύναμες ενέργειες σε ενδογενή miRNA. Δεν είναι σαφές εάν τα εξωγενή miRNAs έχουν επαρκή δραστηριότητα in vivo και υπάρχουν πολλές ανησυχίες σχετικά με τις ανεπιθύμητες ενέργειες και την τοπική διανομή των miRNA. Επιπλέον, αν και οι μέθοδοι παράδοσης για miRNA (συμπεριλαμβανομένης κατά μήκος του φράγματος αίματος-εγκεφάλου) έχουν βελτιωθεί σημαντικά, μόνο μερικές επιλογές είναι εφαρμόσιμες στην πράξη.

## 6. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΑΙΔΟΙΟΥ

**Η** ανεξέλεγκτη έκφραση των microRNAs είναι γνωστή και έχει ήδη αποδειχθεί σε πολλούς τύπους όγκων. Η μελέτη μας χαρακτηρίζει τα microRNA σε όγκους του αιδοίου μέσω ενός προφίλ έκφρασης των 754 miRNAs, που αφορούν αυτά με κλινικά και ανατοπαθολογικά δεδομένα, καθώς και τη παρουσία της HPV λοίμωξης όπως θα αναφέρουμε παρακάτω. Η μειωμένη ρύθμιση του miR-223-5p και του miR-19-b1-5p συσχετίστηκαν με την παρουσία μετάστασης του λεμφαδένα καθώς και η μειωμένη ρύθμιση των miR-100-3p και miR-19-b1-5p συσχετίστηκαν με την παρουσία αγγειακής εισβολής, η υπερέκφραση του miR-519b και miR-133a συνδέθηκαν με προηγμένο FIGO stage. Εν κατακλείδι, η μελέτη δείχνει ότι τα microRNAs μπορεί να είναι κλινικά σημαντικά σε καρκινώματα του αιδοίου και τα ευρήματά μπορούν να βοηθήσουν για περαιτέρω μελέτες σχετικά με τις επιπτώσεις της λειτουργικής απορρύθμισης των miRNA σε αυτόν τον τύπο καρκίνου. Μελέτες που βασίζονται σε επιδημιολογικά, κλινικά, ιστοπαθολογικά, και μοριακά στοιχεία υποδεικνύουν την ύπαρξη δύο κατηγοριών καρκινωμάτων του αιδοίου: μία ομάδα στην οποία το HPV (υψηλού κινδύνου, όπως 16, 18, και 33), εμφανίζεται και αποτελεί κύριο παράγοντα των γυναικών ηλικίας μεταξύ 35 και 65 ετών, και μία δεύτερη ομάδα, που δεν σχετίζονται με τον HPV, στο οποίο είναι γυναίκες ηλικίας από 55 έως 85 ετών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του αιδοίου (VIN) .

Η μόλυνση υψηλού κινδύνου με HPV προκαλεί ογκογόνους τύπους και οι καταστολείς όγκων, ανώμαλη έκφραση των miRNAs. Διάφορα miRNA γονίδια είναι παράγοντες της μεταγραφής όπως το c-myc, p53, και E2F και η έκφραση τους μπορεί να ρυθμίζεται με τους ογκογόνους E6 και E7. Η HPV λοίμωξη σε κύτταρα όγκου μπορεί να ρυθμίσει αρνητικά τα επίπεδα ενός συγκεκριμένου miRNA (miR-34a) μέσω της αναστολής της p53 από την ιική πρωτεΐνη E6 . Ιικές πρωτεΐνες E6 και E7 του HPV προκαλούν μείωση του miR-218, ένα ογκοκατασταλτικό microRNA, το miR-125b μπορεί να μειώσει άμεσα τον πολλαπλασιασμό του ιού HPV in vitro. Η απενεργοποίηση αυτού του miRNA χωρίς την παρουσία του ιού είναι ικανή να διεγείρει κυτταρικές αλλαγές που μιμούνται τα κοίλοκύτταρα.

Μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά μόρια έχουν δυναμικό προγνωστικό ρόλο για τον καρκίνο του αιδοίου, όπως c-KIT, p14ARF , και της β-κατενίνης. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, η προτιμώμενη θεραπεία για αυτήν την κατάσταση είναι η χειρουργική και ο πιο σημαντικός κλινικός προγνωστικός παράγοντας στον καρκίνο του αιδοίου είναι η

κατάσταση των λεμφαδένων. Λίγα είναι γνωστά για τους προγνωστικούς παράγοντες που μπορούν να παρέχουν πράγματι μια καλύτερη ψυχοκοινωνική ποιότητα ζωής για τις γυναίκες που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του αιδοίου.

Τα microRNAs δεν έχουν μελετηθεί ποτέ στον καρκίνο του αιδοίου, και πρόσφατα πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης των 754 microRNAs για να περιγράψει το signatures microRNA σε καρκινώμα του αιδοίου, με στόχο να προσφέρει το συνολικό προφίλ των microRNA σε αυτόν τον τύπο του καρκίνου, στο οποίο και οι δύο αιτιολογικές ομάδες αξιολογήθηκαν, λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία του HPV σε αυτόν τον τύπο του όγκου και την ικανότητά να διαμορφώνουν microRNAs, αξιολογήθηκε επίσης η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των microRNA σε HPV αρνητικά δείγματα με κλινικά δεδομένα προκειμένου να αποφευχθεί η παρεμβολή σε ιογενείς οδούς των microRNA. Το miR-21 έχει αποδειχθεί ως ένα ογκογονίδιο ικανό να ρυθμίζει το γονίδιο Bcl-2. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του miR-21, με τη σειρά του ενεργοποιείται από το CD44, και έχει αποδειχθεί ότι έχει σημασία στην αντοχή πολλών φαρμάκων.

Πρωταρχικής σημασίας, το miR-21 και miR-106b βρίσκονται κοντά στις θέσεις ενσωμάτωσης του HPV, που δείχνουν ότι αυτά τα microRNAs μπορεί να έχουν επιπτώσεις στον καρκίνο του αιδοίου, ένας όγκος στον οποίο το HPV έχει ήδη δείξει ότι έχει σχετική κλινική σημασία. Το miR-106 βρέθηκε να ρυθμίζεται αυξητικά μεταξύ των HPV-θετικών δειγμάτων. Στην πραγματικότητα, αυτό το microRNA έχει φανεί ως υποκινητής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της αύξησης του cyclinD1 (CCND1) και E2F με ενδοκυτταρική δραστηριότητα. Η μειωμένη έκφραση του miR-365 έχει βρεθεί σε HPV-αρνητικά δείγματα.

Nie και οι συνεργάτες του(2014) έδειξαν ότι η μειωμένη ρύθμιση του miR-365 συνδέθηκε με την εξέλιξη του όγκου και τη κακή επιβίωση και ότι αυτό το microRNA μπορεί να έχει αντικαρκινική δράση, λόγω του CCND1 και Bcl2, το οποίο οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την ενεργοποίηση απόπτωσης. Μεταξύ των HPV-θετικών δειγμάτων, η έκφραση αυτών των microRNAs ήταν μειωμένη, το οποίο μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την υψηλή πολλαπλασιαστική κατάσταση των HPV-θετικών όγκων.

Τέλος, το miR-16, βρέθηκε αυξημένο μεταξύ των HPV-αρνητικών δειγμάτων, αποδείχθηκε ότι έχει αντικαρκινική δράση μέσω της αναστολής των CCND1, CCND2, CCND3, bcl-2, και άλλα γονίδια. Κατά τη στόχευση του CCND1 και του CCND2, το miR-16 φαίνεται να επάγει τη διακοπή της G1 φάσης. Σε επιθηλιακά κύτταρα ωοθηκικού καρκίνου, το miR-26 έχει αυξημένη ρύθμιση που συνέβαλε στην αναστολή του πολλαπλασιασμού, την εισβολή και την αυξημένη ευαισθησία σε αποπτωτικά

ερεθίσματα. Συνοψίζοντας, περιγραφικά την ανάλυση της έκφρασης των microRNA στον καρκίνο του αιδοίου οι μελέτες έδειξαν 25 εκφράζομενα διαφορετικά microRNAs μεταξύ των HPV-θετικών και των HPV-αρνητικών όγκων, και 79 αλλοιωμένα microRNAs στον καρκίνο συγκριτικά με το φυσιολογικό ιστό του αιδοίου, όλα αυτά με μειωμένη έκφραση στους όγκους σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα .

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των microRNAs και τον αλγόριθμο που βασίζονται οι προβλέψεις των mRNA που περιγράφηκαν προηγουμένως μπορεί να έχουν σημασία για τον καρκίνο του αιδοίου και, ως εκ τούτου πιστεύουμε ότι τα microRNAs αφού αξιολογηθούν μπορούν να συμμετέχουν στην εξέλιξη του καρκίνου και στη λειτουργία τους σε HPV λοίμωξη. Τρία microRNAs (miR-223-5p, miR-19b-1-5p και miR-133a) συσχετίστηκαν με σημαντικά κλινικά και ανατοπαθολογικά χαρακτηριστικά στον καρκίνο του αιδοίου. Τα ευρήματά μπορούν να βοηθήσουν στο μέλλον σε αναλύσεις και να αποκαλύψουν τις πραγματικές λειτουργίες των miRNAs σε αυτή τη νόσο, χαρακτηρίζοντάς' τα ως βιοδείκτες για τον καθορισμό και τη προγνωστική αξία της ανταπόκρισης τους σε νέες θεραπείες που στοχεύουν στον καρκίνο του αιδοίου. (36).

**V. ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ microRNA ΣΕ  
ΟΡΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΜΗ  
ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥΣ (ΑΠΟ  
ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ)**

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ V. ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ microRNA ΣΕ ΟΡΟ**

## **ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΜΗ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥΣ**

### **ΚΑΡΚΙΝΟΥΣ (ΑΠΟ ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ)**

#### **7. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ**

**Ο** Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ένας γυναικολογικός καρκίνος με υψηλή συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητα. Είναι ένας πρωτογενής καρκίνος και έχει υψηλή συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητα. Η θνησιμότητα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας μειώνεται σε χώρες με προηγμένα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης, αλλά η επιπτώσεις εξακολουθούν να είναι υψηλές στις αναπτυσσόμενες χώρες και η ασθένεια είναι η δεύτερη πιο κοινή στους γυναικείους καρκίνους σε όλο τον κόσμο. Η πρόληψη, η διάγνωση και η θεραπεία της ασθένειας είναι ολοένα και πιο σημαντική σε ζητήματα που οφείλονται σε αλλαγές του τρόπου ζωής των γυναικών, συμπεριλαμβανομένης της συμμετοχής του εργατικού δυναμικού και την αύξηση του προσδόκιμου ζωής.

Τα microRNAs (miRNAs) εμπλέκονται στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και το παθογόνο μηχανισμό του καρκίνου, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία τους στη διάγνωση και τη θεραπεία. Τα miRNAs μπορεί να έχουν ρόλους στην παθογένεση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας με βάση τις αυξήσεις ή τις μειώσεις σε πολλά ειδικά miRNAs που ανευρέθηκαν σε ασθενείς με την ασθένεια αυτή. Τα miRNAs που εμπλέκονται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας είναι το miR-21, miR-126 και miR-143, και η κλινική εφαρμογή αυτών για τη διάγνωση και θεραπεία είναι υπό διερεύνηση. Μέθοδοι για τη διάγνωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας περιλαμβάνουν την ανάλυση των μεταβολών στα επίπεδα των ειδικών miRNAs στον ορό και προσδιορισμό της ανώμαλης υπερμεθυλίωσης των miRNAs. Η συμπλήρωση του miR-143 ή η αναστολή του miR-21 στη δραστηριότητα ίν νίνο μπορεί να έχει θεραπευτική στρατηγική για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (37).

## 7.1 Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας από τον ιό HPV

Ο καρκίνος του τραχήλου εμφανίζεται κυρίως λόγω της μακροχρόνιας μόλυνσης με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV). Η HPV λοίμωξη σχετίζεται με τη σεξουαλική επαφή. Το HPV εισβάλλει στα βασικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας μέσω του βλεννογόνου δέρματος που έχει πληγεί από τη συνουσία και διατηρείται ως επίσωμα.

Στην έρευνα του καρκίνου του τραχήλου CC, ο Λι και οι συνεργάτες(2013) του ανέλυσαν τη διαφορετική έκφραση, μέσω της TaqMan real-time quantitative PCR array, από 157 ανθρώπινα miRNAs (27). Η έρευνα περιελάμβανε δέκα βιοψίες των όγκων, που διαγνώστηκαν ως πρωτοπαθή διηθητικά ακανθοκυτταρικά καρκινώματα (ISCC), και δέκα φυσιολογικούς ιστούς. Διαπίστωσαν ότι τα 70 miRNAs ήταν σημαντικά διαφορεικά εκφρασμένα, 68 από αυτά είχαν αυξημένη έκφραση και δύο είχαν μειωμένη. Μεταξύ αυτών, 10 miRNAs υπερ-εκφράζονταν 100 φορές παραπάνω. Τα δέκα καλύτερα miRNAs που υπερ-εκφράζονταν ήταν τα miR-199-s, miR-9, miR199a \*, miR-199a, 199b miR-του miR-145 , miR-133a, 133b miR-του miR-214 και το miR-127. Από την άλλη πλευρά, δύο μόνο miRNAs που υποεκφράζονταν ήταν το miR-149 και το miR-203. Είναι ενδιαφέρον ότι, η έκφραση του miR-127 σχετίζεται σημαντικά με μετάσταση στους λεμφαδένες. Τέλος, επέλεξαν το miR-199a για να εμποδίσει την έκφραση μέσω της διαμόλυνσης με το αντι-miR-199a στο CC που προέρχεται από κυτταρικές σειρές, που δείχνουν σημαντική μείωση στην κυτταρική ανάπτυξη .

Σε μια μεγαλύτερη μελέτη με 102 βιοψίες όγκου CC, το προφίλ έκφρασης από 96 miRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο αναλύθηκαν με quantitative RT-PCR . Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ένα μαθηματικό αλγόριθμο, ώστε να επιλέξουν 10 miRNAs που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να προβλέψει τη συνολική επιβίωση στην ομάδα των ασθενών. Μεταξύ των επιλεγμένων miRNAs, το miR-200a και το miR-9 συσχετίστηκαν σημαντικά με τη συνολική επιβίωση. Τέλος, αναλύθηκαν τα μεμονωμένα επιμολυσμένα miR-200A και miR-9 σε κύτταρα HeLa, και το προφίλ έκφρασης των επιμολυσμένων αυτών κυττάρων. Οι αναλύσεις των γονιδίων αυτών βασίζονται στη βοήθεια σετ γονιδίων εμπλουτισμού και έδειξαν ότι το miR-200a θα μπορούσε να ρυθμίσει το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων που μεταναστεύουν σε μακρινές τοποθεσίες. Ως εκ τούτου, τα miR-200a θα μπορούσε να ελέγξει το φαινότυπο του καρκίνου με τη ρύθμιση των διαδικασιών της μετάστασης, ενώ τα γονίδια που ρυθμίζονται από το miR-9 συμμετείχαν σε μεταβολικές διεργασίες, εξηγώντας τη διατήρηση του υψηλού μεταβολικού ρυθμού από τα καρκινικά κύτταρα, ένα σημαντικό ζήτημα για την ταχεία διάδοση καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας.

Στην ίδια έρευνα, Pereira et al.(2014), ανέλυσε την διαφορετική έκφραση που σχετίζεται με την εξέλιξη του CC, χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί ιστοί, με μέτρια / σοβαρή δυσπλασία και διηθητικό καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων που έχουν μολυνθεί με αλληλουχίες HPV16. Ως εκ τούτου, εντόπισαν αλλοιωμένη έκφραση σε 10 miRNAs μεταξύ της δυσπλασίας του καρκίνου των ιστών σε σύγκριση με κανονικούς ιστούς του τραχήλου της μήτρας (miR-16, miR-21, miR-106b, miR-135b, miR-141, το miR-223, το miR-301b, και miR-449A όπου σημαντικά υπερεκφράζονταν). Ειδικότερα, τα miR-21, miR-135b, miR-223, το miR-301b, και το miR-135b ήταν σημαντικά υπερ-εκφραζόμενα σε CC ιστό σε σύγκριση με το φυσιολογικό και τη δυσπλασία των ιστών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παραπάνω λίστα των miRNAs μπορεί να είναι χρήσιμη για τη διάκριση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας από φυσιολογικό ιστό.

Πρόσφατα, οι αναλύσεις με quantitative RT-PCR (qRT-PCR) δημοσιεύσαν την έκφραση του miR-100 σε 125 ιστούς του τραχήλου της μήτρας συμπεριλαμβανομένου του φυσιολογικού τραχηλικού επιθηλίου, της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN), και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, καθώς επίσης και σε πέντε κυτταρικές σειρές του τραχήλου της μήτρας. Η έκφραση του MiR-100 εμφάνισε σημαντικά σταδιακή μειωμένη τάση από χαμηλού βαθμού CIN, σε υψηλού βαθμού CIN του τραχήλου της μήτρας σε καρκινικούς ιστούς, καθώς και μια σημαντική μείωση του HPV του τραχήλου της μήτρας σε κυτταρικές σειρές θετικές στο καρκίνο. Είναι αξιοσημείωτο ότι η έκφραση του miR-100 επηρέασε αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, και την αυξημένη απόπτωση του κυτταρικού κύκλου, πιθανώς μέσω της πρωτεΐνης PLK1 (Polo-like-kinase1). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του PLK1 σχετίστηκε αρνητικά με την έκφραση του miR-100 σε CIN3 και σε καρκινικούς ιστούς του τραχήλου της μήτρας. Τέλος, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το miR-100 συμμετέχει στην ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου, τουλάχιστον μερικώς, μέσω της απώλειας της αναστολής του γονιδίου-στόχου PLK1, η οποία εμφανίζεται πιθανώς με σχετική όψιμη φάση της καρκινογένεσης.

Όσον αφορά την εξέλιξη της CC, που σχετίζεται με τον HPV, 16 μολυσμένα δείγματα σε 18 καρκινικούς ιστούς, Li et al(2011), χρησιμοποίησε 18 ιστούς που ελήφθησαν από φυσιολογικά δείγματα, CIN 2-3 και βιοψίες με πλακώδη καρκινώματα, χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες miRNAs, ανακάλυψαν 875 ανθρώπινα miRNAs. Τα ευρήματα έδειξαν 31 μοναδικά miRNAs με σημαντικά αυξημένη έκφραση από την κανονική σε CC (17 ως αυξανο-ρυθμιζόμενα και 14 με μειωμένη ρύθμιση). Μεταξύ αυτών, το miR-218 ήταν με μειωμένη έκφραση από την κανονική σε CC, ενώ το miR-29 έδειξε μια υπερ-έκφραση. Επιπλέον, έδειξαν μια σημαντική αρνητική συσχέτιση της



έκφρασης του YY1 και CDK6 με το miR-29, και προτάθηκε ότι το επίπεδο έκφρασης των miR-29 θα μπορούσε να ρυθμιστεί με HR-HPV E6 / E7 (38).

## 7.2 P53 και miRNA

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι εμπλέκονται τα επαγόμενα- miRNA με ανώμαλους ρυθμιστικούς μηχανισμούς στην παθογένεση πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των κακοηθών όγκων. Τα miRNAs ταξινομούνται σε ογκογόνα και καταστολείς όγκου miRNAs, και το επίπεδο έκφρασης των miRNA μειώνεται συχνά σε ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς. Έτσι, πολλά miRNAs μπορεί να έχουν δυναμικό για την καταστολή των όγκων, συμπεριλαμβανομένων των miRNAs που σχετίζονται με το γονίδιο p53.

Georges et al. και Braun et al. (2007) ανακάλυψαν ότι το miR-192, το miR-194 και το miR-215 προκαλούνται από βλάβη του DNA στο p53 με εξαρτώμενο τρόπο, ενώ ο Yan et al. (2013) προσδιόρισε το miR-17-92 συμπλέγμα δρα ως κατασταλτικό miRNA από το p53 σε συνθήκες υποξίας. Εξετάσεις για τα miRNAs που ρυθμίζουν το μονοπάτι του p53 έδειξε ότι η οικογένεια miR-29 (miR-29a, miR-29b, και του miR-29c) ενεργοποιεί το μονοπάτι p53. Επιπλέον, το miR-122 ρυθμίζει θετικά την πορεία του p53 μέσω του κύκλου G1, το miR-125β αναστέλλει άμεσα το p53, και το miR-21 ρυθμίζει αρνητικά την οδό του p53 με τη στόχευση ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεΐνη K (HNPRK), ένα θετικό ρυθμιστή του μονοπατιού p53, και το ομόλογο p53, p63. Τα miRNA μπορούν επίσης να επηρεάσουν προς τα κάτω το μονοπάτι του p53, με βάση την αρνητική ρύθμιση του επαγόμενου p53 αναστέλλοντας το CDK με το miR-372 και το miR-373 μέσω LATS2 (37).

## 7.3 Αλλαγές των miRNA στο καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

Μεγάλης κλίμακας κλινικών δειγμάτων της ανάλυσης μικροσυστοιχιών miRNA ήταν αποτελεσματική για την αξιολόγηση των αλλαγών έκφρασης των miRNA. Αυτή η ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συγκρίνει τους φυσιολογικούς και τους καρκινικούς ιστούς, τις πρωτογενείς βλάβες και τις μεταστατικές / επαναλαμβανόμενες βλάβες, καθώς και το προφίλ έκφρασης των miRNA πριν και μετά την αντικαρκινική θεραπεία. Αναλύσεις μικροσυστοιχιών μεγάλης κλίμακας έχουν δείξει ιδιαίτερη έκφραση των miRNA σε συγκεκριμένους τύπους

καρκίνου. Περαιτέρω εξετάσεις των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας ποσοτική RT-PCR σε κλινικά δείγματα έχουν δείξει τη σχέση των miRNAs με τα χαρακτηριστικά του καρκίνου. Με τη σύγκριση της έκφρασης των miRNA σε φυσιολογικούς ιστούς και καρκινικούς, πολλά miRNAs έχουν βρθεί με καρκίνο-ειδική διέγερση (oncomiRs) ή κατασταλτική ρύθμιση (ογκοκατασταλτικό MIRS).

Πολλά oncomiRs έχουν ανακαλυφθεί σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Μεταξύ αυτών, το miR-21 όπου υπερεκφράζεται σε πολλά είδη καρκίνου και είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PDCD4) (Πίνακας 1). Η έκφραση του PDCD4 εμπλέκεται στην απόπτωση και, επίσης, αποκλείει τη μετάφραση και αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου, και το miR-21 προσδένεται στο PDCD4 3' UTR και ενισχύει την ανάπτυξη των κυττάρων. Το miR-21 ρυθμίζει επίσης το CCL20, το οποίο εμπλέκεται στη διαφοροποίηση του όγκου και σε οζώδης μετάστασεις. Το miR-10a ενισχύει την ανάπτυξη όγκου, τη μετάσταση, την εισβολή και καταστέλλει την έκφραση του CHL1, ενώ το miR-19a και το miR-19b υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας και εμπλέκονται στην απόπτωση κακοηθιών με τα κύτταρα HeLa και C33A. Το miR-19a και miR-19b ενισχύουν την ανάπτυξη των κυττάρων και την εισβολή, επίσης το miR-19a και miR-19b ως ανενεργά κύτταρα είναι καλοήγη. Το Cullin 5 (CUL5) απευθύνεται τόσο στο miR-19a όσο και στο miR-19b, αλλά η έκφραση του CUL5 εξαιρουμένου του 3' UTR μειώνει την ανάπτυξη των κυττάρων και την εισβολή που προκαλείται από τα miR-19a και miR-19b. Το miR-20 ενισχύει την έκφραση της κινάσης και της τυροσίνης του ογκογονιδίου, μη υποδεκτικές 2 (TNKS2). Μόλις το TNKS2 καταστέλλεται, η μετάσταση και εισβολή των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου καταστέλλονται. Ωστόσο, το miR-20 ρυθμίζει θετικά το TNKS2, με αποτέλεσμα την ενισχυμένη μετάσταση και εισβολή.

Η καρκινογένεση και μετάσταση στον πνεύμονα παρήχθει με ένεση καρκινικών κυττάρων του τραχήλου με υπερέκφραση του miR-133b. Η λανθάνουσα περίοδος του καρκινικού νεοπλάσματος συντομεύεται με αυξημένη έκφραση του miR-133b, γεγονός που καθιστά το miR-133b ως δείκτη για πρώιμο καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

**Πίνακας 6: Expression of microRNAs in cervical cancer cell.**

Overexpressed miRNAs	Chromosome	Underexpressed miRNAs	Chromosome
miR-15a	13	miR-1	1
miR-15b	3	miR-7	10
miR-16	13	miR-10b	2
miR-17-5p	13	miR-29a	7
miR-19a	4	miR-30b	8
miR-20a	13	miR-100	11
miR-20b	X	miR-124	6
miR-21	17	miR-126	9
miR-27b	9	miR-138	13
miR-93	7	miR-143	5
miR-106a	X	miR-145	5
miR-133b	18	miR-149	2
miR-146	5	miR-194	4
miR-183	8	miR-195	19
miR-185	22	miR-214	1
miR-193b	16	miR-218	1
miR-196a	9	miR-376a	14
miR-199a	19	miR-422a	15
miR-203	14	miR-424	X
miR-210	11	miR-450	X
miR-224	X	miR-451	17
miR-324-5p	17	miR-455	9
miR-372	11	miR-487b	14
miR-373	3	miR-495	14
miR-375	2	miR-574	4
miR-432	14		
miR-503	X		
miR-641	19		
miR-1286	22		
miR-1290	1		
miR-2392	26		
miR-3147	7		
miR-3162-5p	11		
miR-4484	4		

Πολλές μελέτες έχουν εξετάσει επίσης τα ογκοκατασταλτικά miRNAs. Για παράδειγμα, το miR-138 εμπλέκεται στη ρύθμιση της τελομεράσης, ενός ενζύμου που συνδέεται στενά με την κυτταρική αθανатоποίηση και την καρκινογένεση μέσω της επέκτασης των τελομερών στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Η δραστηριότητα της τελομεράσης εξαρτάται από την έκφραση της ανθρώπινης τελομεράσης αναστροφής μεταγραφάσης (hTERT) και το miR-138 καταστέλλει το επίπεδο mRNA hTERT και μειώνει τη δράση της τελομεράσης. Η έκφραση του miR-138 σε κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι σημαντικά χαμηλότερη από ότι σε φυσιολογικούς ιστούς, η οποία προκαλεί την ενεργοποίηση της τελομεράσης και την καρκινογένεση (Πίνακας 1).

Σε HeLa και C33 καρκινικά κύτταρα του τραχήλου, το miR-7 υπερεκφράζεται και αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων και ενισχύει την απόπτωση, ενώ η καταστολή του miR-7 στην έκφραση έχει αντίθετα αποτελέσματα. Το miR-7 στοχεύει και ρυθμίζει το X-συνδεδεμένο αναστολέα της πρωτεΐνης της απόπτωσης (XIAP). Ως εκ τούτου, το miR-7 είναι ένα ογκοκατασταλτικό miRNA. Το miR-17-5p πρωτεΐνη στόχου του όγκου p53 προκαλούμενη από τη πυρηνική protein1 (TP53INP1) αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων, οδηγώντας σε απόπτωση. Το TP53INP1 παίζει σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις στρες στα κύτταρα και το miR-17-5p επάγει την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης εάν το TP53INP1 εκφράζεται έκτοπα. Μια παρόμοια σχέση μεταξύ του TP53INP1 και του miR-17-5p έχει βρεθεί στους καρκινικούς ιστούς. Ως εκ τούτου, το miR-17-5p μπορεί επίσης να είναι ένα ογκοκατασταλτικό miRNA.

Cui et al.(2009) ανέλυσαν την ανάπτυξη των κυττάρων και την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας με δοκιμασία MTT και κυτταρομετρία ροής και έδειξαν ότι η υπερέκφραση του miR-125b ανέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων, η επαγόμενη απόπτωση και η μειωμένη ογκογονικότητα με τη καταστολή της φωσφοϊνοσιτιδής 3-κινάσης δέλτα καταλυτικής υπομονάδας (PIK3CD) μέσω της στόχευσης του στο PI3 K / Akt / mTOR. (44)

**Πίνακας 7: Λίστα έκφρασης των microRNAs που βρέθηκαν σε καρκίνο του τραχήλου σε δείγματα αίματος, πλάσμα / ορό και στα ούρα.**

Type of cancer	Detailed specification	Up-regulated microRNAs	Down-regulated microRNAs	Sample source	Methodology	Reference
<b>Cervical carcinoma</b>	Squamous cell cervical cancers (n = 71), cervical adenocarcinoma (n = 19). Control samples (n = 50).		miR-218	Blood serum	Taqman microRNA real time PCR	(39)
<b>Cervical carcinoma</b>	Cervical squamous cell carcinomas (n = 80). Control samples (n = 20).	miR-1246, miR-20a, miR-2392, miR-3147, miR-3162-5p miR-4484		Blood serum	Human microRNA OneArray, SYBR Green real time PCR	(40)
<b>Cervical carcinoma</b>	Cervical squamous cell carcinoma (n = 80). Control samples (n = 20).	miR-20a, miR-203		Blood serum	SYBR Green PCR kit, BIO-chromo4 (Bio-Rad) Real- Time PCR System	(41)

## 7.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ microRNA ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

Αντικαρκινική θεραπεία μπορεί να επιτευχθεί με τη ρύθμιση του επιπέδου έκφρασης των miRNAs. Αυτό θα μπορούσε να περιλαμβάνει την αναστολή της λειτουργίας των miRNAs (oncomiRs) που υπερεκφράζονται στο καρκίνο με χορήγηση συμπληρωματικών αλληλουχιών νουκλεϊνικού οξέος ή μειώνοντας το πραγματικό επίπεδο έκφρασης τους. Σε αντίθεση, η λειτουργία των miRNAs (ογκοκατασταλτικών MIRS) με μειωμένα επίπεδα στον καρκίνο μπορεί να ανακτηθεί από την συμπλήρωση του ίδιου του miRNA. Και οι δύο στρατηγικές χρησιμοποιούν συνθετικά νουκλεϊνικά οξέα που βασίζονται σε φάρμακα τα οποία απαιτούν συστήματα μεταβίβασης. Παρόμοια μεταβίβαση συνθετικών νουκλεϊκών οξέων υπάρχει στην ανάπτυξη των siRNAs ως θεραπευτικοί παράγοντες, και οι δυσκολίες στην μεταβίβαση είναι ένας λόγος γιατί οι *in vitro* επιδράσεις συχνά δεν επιτυγχάνονται *in vivo*. Το σύστημα μεταβίβασης είναι απαραίτητο για να εξασφαλιστεί η σταθερότητα *in vivo* και για την αποτελεσματικά ασφαλή εισαγωγή νουκλεϊκού οξέος που βασίζεται σε κυτταρικά φάρμακα.

Προηγούμενες προσεγγίσεις για την ανάπτυξη του siRNA ως φάρμακο παρείχαν πληροφορίες για την ίδρυση της θεραπείας που βασίζονται σε αυτές τις προσεγγίσεις, και έναν αναστολέα αντι-miR-21 που έχει αναπτυχθεί. Τα miRNAs έχουν επίσης συνέπειες στην αντίσταση στα φάρμακα και μπορεί να είναι χρήσιμα στη θεραπεία συνδυασμού με άλλα φάρμακα.

Το ατελοκολλαγόνο, είναι μια πρωτεΐνη που σχηματίζεται στη περιοχή του ακροδέκτη (τελοπεπτιδίου) του κολλαγόνου τύπου I, εξετάζεται ως ένα δυναμικό σύστημα χορήγησης για νουκλεϊκό οξύ ως βάση στα φάρμακα. Αυτή η πρωτεΐνη εξάγεται από το χόριο μοσχάριου, καθαρίζεται και στη συνέχεια υπέστη πέψη με πρωτεάση για να μειωθεί η αντιγονικότητά της. Το ατελοκολλαγόνο είναι θετικά φορτισμένο υπό φυσιολογικές συνθήκες και σχηματίζει ένα σύμπλοκο με αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊνικά οξέα που βασίζονται σε παράγοντες. Αυτό το σύμπλοκο μπορεί να μεταφερθεί σταθερά σε ιστούς και κύτταρα.

Σε αντίθεση με τα siRNA, τα miRNAs μπορούν να έχουν συνέπειες, χωρίς να χρειάζεται πλήρη συμπληρωματικότητα με στόχευμένα mRNA. Ως εκ τούτου, ένα miRNA μπορεί να καταστείλει πολλούς στόχους. Αυτό είναι ένα μειονέκτημα σε μια φαρμακευτική μελέτη αφού η ειδικότητα του μειώνεται. Ωστόσο, οι πολλαπλοί στόχοι εξέλιξαν τα miRNAs, και τις ομάδες γονιδίων που σχετίζονται με τη κοινή τους

λειτουργία. Ως εκ τούτου, η εισαγωγή ενός miRNA καταστέλλει πολλαπλά γονίδια στο ίδιο μονοπάτι σηματοδότησης, και ένα miRNA μπορεί να έχει επίδραση παρόμοια με εκείνη της ταυτόχρονης εισαγωγής πολλαπλών siRNAs για αυτά τα γονίδια. Σε αυτό το πλαίσιο, το συμπληρωματικό miR-34 χρησιμοποιώντας το δίκλωνο RNA είναι υπό ανάπτυξη ως μία θεραπευτική προσέγγιση (37).

## 7.5 Η παρουσία των miRNAs και η θεραπευτική αντίσταση στο καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

Η έκφραση των διαφόρων miRNAs είναι αυξημένη ή μειωμένη σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και αυτά τα επίπεδα έκφρασης μπορεί να αυξήσουν ή να μειώσουν την ευαισθησία στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Phuah et al. έδειξε ότι τα πρότυπα έκφρασης των 25 miRNAs, συμπεριλαμβανομένων του miR-138, το miR-210 και miR-744, τροποποίησαν την ευαισθησία στη 1'S-1'-acetoxychavicol (ACA) και τη σισπλατίνη. Έτσι, τα miRNAs μπορούν να έχουν ένα σημαντικό ρόλο στην απόκριση στη χημειοθεραπεία.

Lei et al.(2013) βρέθηκε ότι το miR-155 ρυθμίζει αρνητικά την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση του επαγόμενου EGF (EMT), αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση, και την εισβολή, και αυξάνει την ευαισθησία στην cisplatin. Το miR-214 ρυθμίζει προς τα πάνω την έκφραση του Bax, της κασπάσης-9, κασπάσης-8, και της κασπάσης-3, ενισχύει την απόπτωση και αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων, και αυξάνει την ευαισθησία στην cisplatin με αποσιώπηση της έκφρασης του Bcl2l2, και το miR-218 επάγει την απόπτωση, καταστέλλει την ανάπτυξη του όγκου και αυξάνει την ευαισθησία στην cisplatin μέσω της οδού σηματοδότησης AKT-mTOR σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας.

Άλλα miRNAs εμπλέκονται στην αντίσταση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Έτσι, το miR-375 συμβάλλει στην απόκτηση αντοχής στη paclitaxel σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, ενώ οι Ke et al.(2010) έδειξαν ότι το miR-181a αυξάνει την κυτταρική ανθεκτικότητα στην ακτινοθεραπεία μέσω της αρνητικής ρύθμισης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών της κινάσης (PRKCD), η οποία καταστέλλει την προκαλούμενη από ακτινοβολία απόπτωση και μειώνει G2 / M φάση.

Στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, η σισπλατίνη μπορεί να είναι το φάρμακο επιλογής σε περιπτώσεις όπου η έκφραση miRNA παράγει όγκους που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην cisplatin ή paclitaxel. Μια λεπτομερής κατανόηση των μηχανισμών των miRNA μπορούν επίσης να επιτρέψουν στοχευμένες θεραπευτικές στρατηγικές που βασίζονται στην αναστολή ή συμπλήρωση των miRNA. Εάν η υπερέκφραση ενός

συγκεκριμένου miRNA προκαλεί αντίσταση στη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία, η αντίσταση μπορεί να μειωθεί με την αναστολή της λειτουργίας των miRNA. Ομοίως, εάν η μειορρύθμιση ενός miRNA προκαλεί αντίσταση, αυτό μπορεί να βελτιωθεί με την συμπλήρωση αυτού του miRNA. Ως εκ τούτου, μπορεί να αναπτυχθεί νέα θεραπεία με το συνδυασμό αναστολέων ή συμπληρωμάτων miRNA με χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Τέτοιες θεραπευτικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούν τα miRNAs με διακριτά πρότυπα έκφρασης μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στην εξατομικευμένη θεραπεία και μοριακή στοχευμένη θεραπεία για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (37).

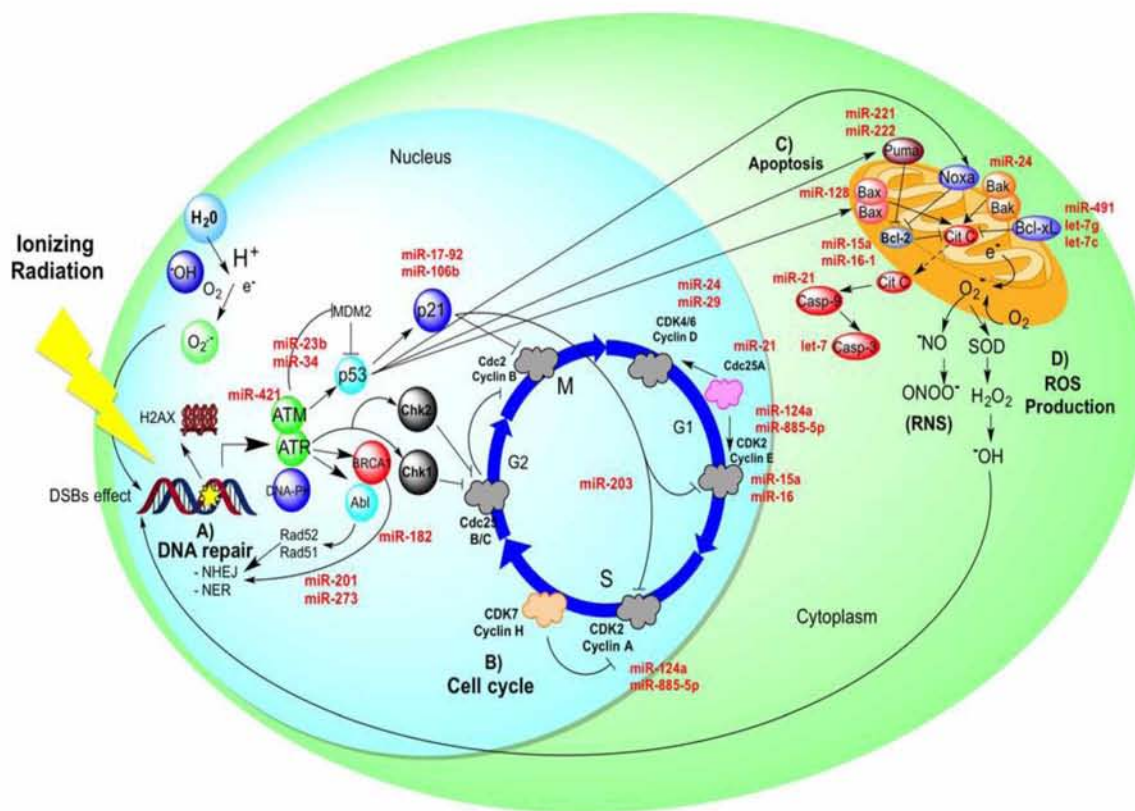
## **7.6 Ράδιο-Αντίσταση στον Καρκίνο του Τραχήλου της Μήτρας ελεγχόμενη από τα miRNAs**

**Η** αντίσταση στην ακτινοβολία είναι ένα τρέχον πρόβλημα στην θεραπεία και την κλινική διαχείριση για διάφορους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου, του παγκρέατος, του οισοφάγου, του μαστού, του πνεύμονα και άλλων. Για αυτούς τους όγκους η ακτινοθεραπεία είναι η πρώτη επιλογή θεραπείας. Η ακτινοβολία προκαλεί θανατηφόρα αποτελέσματα επί των κυττάρων μέσω της τροποποίησης των επιπέδων έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων και με την παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες είναι η πηγή για αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και αντιδρώντα είδη αζώτου (RNS). Τα ROS και RNS έχουν άμεσο αντίκτυπο και βλάπτουν την ακεραιότητα του γενωμικού DNA. Ορισμένες πρωτεΐνες που ενέχονται στην επιδιόρθωση του DNA έχουν ταυτοποιηθεί, όπως για παράδειγμα ATM, MRE11, RAD50, BRCA, Rad3 και η DNA-εξαρτώμενη κινάση πρωτεΐνης. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε μία αύξηση στην ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA, προκαλώντας αντίσταση στην ακτινοθεραπεία. Η ραδιοαντοχή των καρκινικών κυττάρων σχετίζεται επίσης με την έκφραση των p53, RAS, RAF-1, BCL-2 και survivin. Παρά των ορισμένων μορίων που συνδέονται με την ύπαρξη στη ραδιοαντοχή, οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν το φαινόμενο παραμένουν ασαφείς.

Σε αυτό το πλαίσιο, μια δημιουργική εργασία σύγκρινε τους ακτινοευαίσθητους και ραδιοανθεκτικούς όγκους του τραχήλου της μήτρας, και εντοπίστηκε ένα υποσύνολο από 121 γονίδια των οποίων η έκφραση ήταν σημαντικά υψηλότερη στα ακτινοευαίσθητα δείγματα, ενώ η έκφραση του 50 γονιδίων με μειωμένη ρύθμιση σε ραδιοανθεκτικά δείγματα. Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν κοινούς μηχανισμούς



που ρυθμίζουν μια πολύπλοκη διαδικασία όπως τη ραδιοαντοχή σε καρκίνο του τραχήλου (Εικόνα 3).



Εικόνα 10: Σημαντική μοριακή διαδικασία που ρυθμίζει τα ραδιοανθεκτικά καρκινικά κύτταρα (38)

Ωστόσο, παρόλο που τέτοιες ανακαλύψεις έχουν φέρει μερική κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ευθύνονται για την κυτταρική ακτινοευαισθησία, η ολοκλήρωση της διαδικασίας μένει αδιευκρίνιστη. Το κομμάτι που λείπει σε αυτό το πολύπλοκο παζλ θα μπορούσε να αποτυπώσει το ρόλο των συγκεκριμένων miRNAs που η έκφραση τους επηρεάζεται από τα ραδιοανθεκτικά κύτταρα. Για το θέμα αυτό, αρκετές αναφορές έχουν συνδέσει τη διαφορετική έκφραση των miRNAs σε ραδιοανθεκτικούς όγκους και κυτταρικές γραμμές (όπως του πνεύμονα, του τραχήλου, καρκίνωμα πλακώδους κυττάρου της κεφαλής και του αυχένα, γλοιοβλαστώματος, και του παχέος εντέρου). Μερικά miRNAs έχουν αναγνωριστεί ως υποστηρικτές των ραδιοάντοχων όπως το miR-421 το οποίο ρυθμίζει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης ATM, το κύριο αισθητήρα που συνδέεται με την ιονίζουσα ακτινοβολία ανταπόκρισης σε συνδυασμό με την ATR και το BRCA. Επιπλέον, το miR-23b και 34a-miR ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης p53, η οποία είναι ο κύριος κυτταρικός αισθητήρας που ανιχνεύει βλάβη του DNA μετά την έκθεση σε ακτινοβολία. Το miR-17-92 και miR-

106b έχουν επηρεάσει σημαντικά μια άλλη πρωτεΐνη, τη p21, η οποία ρυθμίζει άμεσα τον κυτταρικό κύκλο, την πρόληψη αναδιπλασιασμού μέσω Cdc2 και της κυκλίνης B.

Μία σημαντική μελέτη έγινε από το Hu et al.(2011), στην οποία χρησιμοποίησαν 102 δείγματα από ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας υπό τη συνήθη θεραπεία (ραδιοθεραπεία και χημειοθεραπεία), με τη χρήση του προφίλ έκφρασης miRNA σε 96 miRNAs με real time reverse transcription PCR. Εντόπισαν πέντε miRNAs (miR-9, miR-21, miR-200a, miR-218 και του miR-203), που σχετίζονται σημαντικά με τη ραδιοευαισθησία στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Χρησιμοποιώντας χαρακτηριστικό αναδρομικής κατάργησης (RFE) και τεχνικές υποστήριξης (SVM), οι ερευνητές εντόπισαν δύο ραδιοευαίσθητα miRNAs, το miR-200a και miR-9, τα οποία στη συνέχεια επικυρώθηκαν από τις λειτουργικές δοκιμασίες. Τέλος, πρότειναν ένα μοντέλο πρόβλεψης miRNA για τον εντοπισμό ασθενών με CC που θα μπορούσε να επιτύχει τη συμβατική θεραπεία με βάση την χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία.

Αυτές και άλλες παρόμοιες μελέτες παρέχουν μια επισκόπηση του προφίλ έκφρασης των miRNA και της αλληλεπίδρασης μεταξύ miRNA και target-mRNA, τα οποία θα μπορούσε να διευρύνουν την κατανόησή τους σχετικά με τους ρόλους που διαδραματίζουν τα miRNAs στη διαδικασία της ραδιοαντοχής. Παρ'όλα αυτά, το πεδίο είναι ακόμα υποκαλυπτόμενο, καθώς η πλειοψηφία των μελετών είναι περιγραφικές και ο κατάλογος των miRNAs που σχετίζονται με τη ραδιοαντοχή θα μπορούσε να αυξηθεί σημαντικά, η επικύρωση τους μέσω λειτουργικών μελετών είναι μια υποχρεωτική εργασία, ώστε να έχουμε μια πλήρη εικόνα του βιολογικού ρόλου των επιλεγμένων miRNAs. Η απόδοση της χρήσης των νέων τεχνολογιών φαίνεται να είναι δυνατή καθώς και η χρήση στρατηγικών ενσωμάτωσης της γονιδιωματικής είναι αναγκαίο, με έμφαση τη δημιουργία και τη κατανόηση των δικτύων που ρυθμίζονται από τα miRNAs. (38)

## 8. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΚΟΛΠΟΥ

Το κυτταρικό και το ιογενές microRNAs (miRNAs) είναι το προϊόν της μεταγραφής της RNA πολυμεράσης II και ρυθμίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες για την διαφορετική έκφραση τους. Η αλλαγμένη έκφραση των miRNAs σε πολλούς τύπους καρκίνου έχει διερευνηθεί ως δείκτης για πιθανή διάγνωση και θεραπεία. Ο ογκογόνος ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPVs) προκαλεί ανώμαλη έκφραση πολλών κυττάρων miRNAs και η μόλυνση από τον HPV 18 δεν παράγει ανιχνεύσιμο ιικό miRNA. Η αυξημένη έκφραση των miR-16, miR-25, miR-92a, και του miR-378 και η μειωμένη έκφραση των miR-22, miR-27a, miR-29a, και του miR-100 θα μπορούσε να αποδοθεί στην ιογενή ογκοπρωτεΐνη E6 και E7, τα οποία είναι γνωστά για τη στόχευση πολλών κυτταρικών παραγόντων της μεταγραφής. Εξετάστηκαν 158 κολπικά δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων 38 φυσιολογικά, 52 με τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN), και 68 με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (CC), η μελέτη έδειξε μια αξιοσημείωτη αύξηση στην έκφραση οκτώ miRNAs του miR-25, miR-92a, και του miR-378 για την εξέλιξη της βλάβης, αλλά χωρίς προφανή αλλαγή του miR-22, miR-29a, και του miR-100 μεταξύ των HPV μολυσμένων ιστών.

Ο καρκίνος του τραχήλου (CC) είναι η δεύτερη πιο κοινή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών σε όλο τον κόσμο και προκαλείται από εμμένουσα λοίμωξη με τον ογκογόνου ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPVs). Η HPV λοίμωξη έχει επίσης ταυτοποιηθεί ως οριστική καρκινογόνος μορφή του πέους, του αιδοίου, του κόλπου, του πρωκτού και του στοματοφάρυγγα (συμπεριλαμβανομένης της βάσης της γλώσσας και των αμυγδαλών). Μέχρι σήμερα, οι 15 βλεννογόνοι τύποι του HPV θεωρούνται ογκογόνοι ή υψηλού κινδύνου (HR) ιοί HPV, συμπεριλαμβανομένων των HPV 16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68, HPV73, και HPV82.

Ο παραγωγικός κύκλος ζωής του HPV είναι στενά συνδεδεμένος με τη διαφοροποίηση των πλακωδών κυττάρων, και έχουν οργανοτυπικές καλλιέργειες για να αναπτυχθούν, να αυξηθούν αυτοί οι ιοί in vitro (54-7). Η HPV λοίμωξη αρχίζει όταν ιικά σωματίδια εισέλθουν στα αδιαφοροποίητα βασικά επιθηλιακά κύτταρα μέσω μιας απόξεσης ή ενός τραύματος, όπου ιικά πρώιμα γονίδια είναι ρυθμισμένα προς τα πάνω κατά τη διάρκεια της επούλωσης του τραύματος.

Η ενίσχυση του ιικού εξωχρωμοσωμικό DNA και η έκφραση των ιικών πρωτεϊνών του καψιδίου συμβάλουν διαδοχικά στα μεσαία και ανώτερα ακανθώδη και επιφανειακά κύτταρα. Η ενεργός μόλυνση από HPV's HR μπορεί να οδηγήσει σε τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN) βαθμού 1, 2, ή 3 με βάση τον αυξανόμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων στον τραχηλικό επιθήλιο. Ιστολογικά, τα ανώμαλα πολλαπλασιασμένα κύτταρα περιορίζονται στο ένα τρίτο του επιθηλίου σε CIN1. Τα CIN2 και CIN3 διακρίνονται από την επέκταση της νεοπλασίας στα κατώτερα δύο τρίτα (CIN2) ή περισσότερο (CIN3) του επιθηλίου. Το CIN3 μπορεί να περιλαμβάνει το πλήρες πάχος του επιθηλίου και μερικές φορές αναφέρεται ως αυχενικό καρκίνωμα *in situ*. Το CIN2 και CIN3 αναπτύσσονται σε 10-20% των γυναικών με CIN1, και ένα κλάσμα του CIN3 μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνο του τραχήλου CC όταν η νεοπλασία εισβάλλει μέσα στο στρώμα. Δύο ιικές ογκοπρωτεΐνες, η E6 και E7, των HPV's HR αποσταθεροποιούν, αντίστοιχα, δύο κύριες πρωτεΐνες το καταστολέα κυτταρικών όγκων, p53 και του βλαστώματος της αμφιβληστροειδούς πρωτεΐνης (pRB). Αμφότερα οι ιικές πρωτεΐνες λειτουργούν για να υποστηρίξουν την παραγωγική φάση της μόλυνσης στα μετα-μιτωτικά διαφοροποιημένα ακανθώδη κύτταρα. Ωστόσο, η επαναλαμβανόμενη αυξημένη έκφραση του HR HPV, E6 και E7 σε αδιαφοροποίητα βασικά επιθηλιακά κύτταρα ή βλαστοκύτταρα διαταράσσει τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αναστέλλει τη διαφοροποίηση των κυττάρων, προκαλεί βλάβη στα χρωμοσώματα, και αποτρέπει την απόπτωση, καταλήγοντας σε κυτταρική αθανατοποίηση και μετασχηματισμό της βάσης της καρκινογένεσης του HPV. Πράγματι, η έκφραση του ανθρώπινου δυναμικού του HPV E6 και E7 έχει συνέπεια αυξημένο κίνδυνο σε καρκίνο του τραχήλου CC.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 550 miRNA γονίδια για να εκφράσουν περίπου 1.000 miRNAs. Τα miRNAs εκφράζονται διαφορετικά σε πολλούς τύπους κυττάρων του ανθρώπου και στοχεύουν περίπου 60% των γονιδίων. Η παρεκκλίνουσα έκφραση των miRNAs έχει ενοχοποιηθεί σε πολλές νοσηρές καταστάσεις και έχουν διερευνηθεί ως βιοδείκτες για πιθανή διάγνωση ή πρόγνωση ασθενειών του ανθρώπου (15↓-17).

Η λοίμωξη από HPV ρυθμίζει την έκφραση των κυττάρων miRNAs (18↓-20) και την ανώμαλη έκφραση των miRNA στις κυτταρικές σειρές του καρκίνου του τραχήλου CC που προέρχονται για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (21↓-24). Ωστόσο, οι διαφορετικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται οδήγησε σε ποικίλες παρατηρήσεις. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει συστηματική μελέτη για τον εντοπισμό των miRNAs ως υποδοχείς και ειδικών βιοδεικτών για τη διάγνωση της λοίμωξης από HPV ή της εξέλιξης. Με τη χρήση της ανάλυσης miRNA, τη σειρά και την αλληλούχιση RNA (miRNA-Seq), πραγματοποιήθηκε μια διεξοδική εξέταση στο προφίλ των miRNA

στα human foreskin keratinocytes (HFK) ή human vaginal keratinocytes (HVK) προερχόμενα από καλλιέργειες με ή χωρίς μόλυνση HPV 16 ή HPV18. Εντοπίσαμε μια ομάδα miRNAs που ρυθμίζονται από τα HPV18 E6 ή E7. Η αλλαγμένη έκφραση του υποσυνόλου αυτών των miRNAs παρατηρήθηκε επίσης σε HR HPV μολυσμένα από CIN και CC ιστούς και μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης για HPV λοίμωξη ή την εξέλιξη. (42)

## 8.1 HPV16 και HPV18 μόλυνση ρυθμίζει την έκφραση ενός υποσυνόλου των miRNAs υποδοχείς.

Για τη διερεύνηση του γονιδιώματος σε επίπεδο αλλαγών η λοίμωξη που προκαλείται από τον HPV στην έκφραση των miRNA, πρέπει πρώτα να συγκρίνεται με το προφίλ έκφρασης του miRNA στην HFK που προέρχονται από καλλιέργειες με ή χωρίς λοίμωξη HPV 16 με ανάλυση της σειράς των miRNA (Εικ. S1). Όπως φαίνεται στο Σχ. 1Α (Αριστερά, πίνακας 1), η μόλυνση HPV16 οδήγησε σε μειωμένη έκφραση 20 miRNAs υποδοχέων (πράσινο), συμπεριλαμβανομένων των miR-34a, και η αυξημένη έκφραση 22 miRNAs ξενιστή (κόκκινο) ( $P < 0,05$ ), συμπεριλαμβανομένων των miR-16.

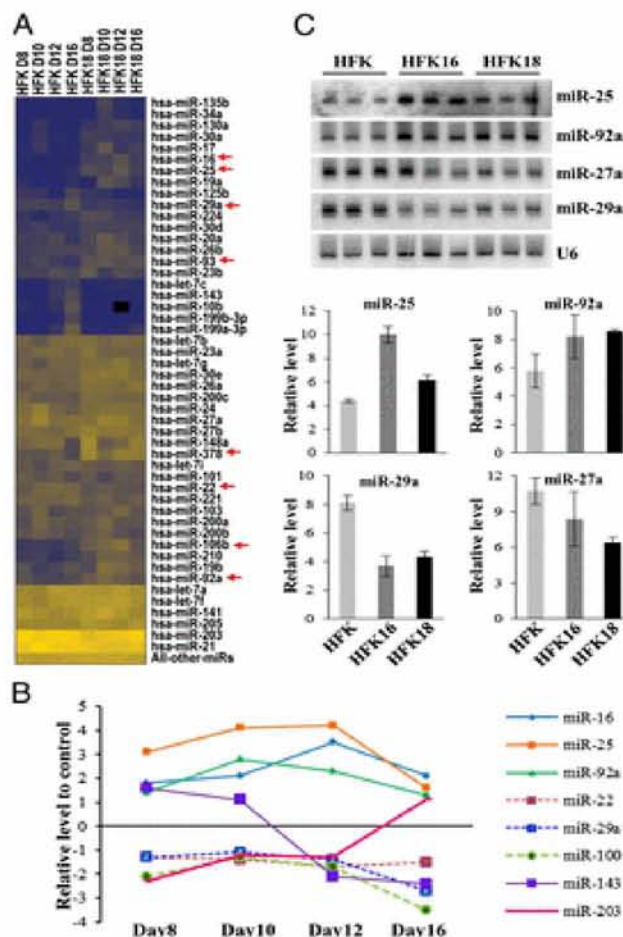
Northern blot analysis επιβεβαίωσε την αλλαγμένη έκφραση του miR-181, το miR-455-3p, miR-203, το miR-375 και του miR-16 (Εικ. 1B, Άνω). Για την ελαχιστοποίηση των πιθανών πειραματικών αποκλίσεων που οφείλονται σε κυτταρικούς τύπους, τους τύπους του ιού, ή μεθόδους ανίχνευσης, επεκτάθηκε η έρευνα στη λοίμωξη HPV 18 σε δύο τύπους κυττάρων με τη χρήση δύο αναλυτικών προσεγγίσεων. Μετά την αρχική επαλήθευση από το Northern blotting η αλλοιωμένη έκφραση του miR-100 και miR-378 σε HFK προερχόμενο από καλλιέργειες με λοίμωξη HPV18 (Σχ. 2B, κάτω), συγκρίνανε περαιτέρω το προφίλ έκφρασης των miRNA σε HFK και HVK προερχόμενα από καλλιέργειες με ή χωρίς λοίμωξη HPV 18 με τη χρήση ανάλυσης της σειράς miRNA και του miRNA-Seq (Εικ. 1Α, Δεξιά, πίνακες 1-3). Οκτώ miRNAs είχαν αυξημένη έκφραση και πέντε miRNAs είχαν μειωμένη έκφραση. Επιβεβαιώθηκε από το Northern blotting η αλλαγμένη έκφραση του miR-16, miR-25, miR-22, και miR-29 σε HVK προερχόμενα από ιστούς που μολύνθηκαν είτε με HPV16 ή HPV18.





Εννέα από τα 13 miRNAs με αλλαγμένη έκφραση στον Πίνακα 1 ήταν στην ομάδα 1 και την ομάδα 2 (Σχ. 2Α και Πίνακας S5) και στο Σχ. 2Β βλέπουμε την επίμονη αύξηση ή μείωση τους κατά τη διάρκεια της μόλυνσης HPV18 σε σχέση με τις μη μολυσμένες καλλιέργειες. Παρατηρήσαμε επίσης μια αρχική αύξηση, αλλά αργότερα μείωση, του miR-143, p53 ευαίσθητο στόχου και το Ras ανταπόκρισης. Σε αντίθεση, το miR-203, είναι ένας δείκτης διαφοροποίησης του δέρματος, εμφανίζεται τη μια με αρχική μείωση, αλλά σταδιακά αυξάνεται σε HFK ιστούς κατά τη διάρκεια του χρόνου της μόλυνσης HPV18 (Εικ. 2Β), σύμφωνα με τα πλακώδες κύτταρα η διαφοροποίηση επιτυγχάνεται σε αυτές τις καλλιέργειες .

Το Northern blotting επιβεβαίωσε την αυξημένη έκφραση του miR-25 και του miR-92a και τη μειωμένη έκφραση του miR-27a και miR-29a σε HFK που προέρχονται από ιστούς την ημέρα 10 μετά την μόλυνση HPV 16 ή HPV 18 (Σχ. 2C). Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα miRNAs στις δύο πρώτες ομάδες ανταποκρίνονται με συνέπεια στη λοίμωξη HPV 18. Ωστόσο, οι απαντήσεις των υποδοχέων των miRNAs στην ομάδα 3 και την ομάδα 4 για μόλυνση HPV18 φαίνεται να ρυθμίζεται από HPV δραστηριότητες και τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, όπως αναφέρθηκε. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα και τα δεδομένα που φαίνονται στο Σχ. 1C και Πίνακα 1, μπορούμε στη συνέχεια να επιλέξουμε οκτώ υποδοχείς miRNAs (miR-16, miR-22, miR-25, miR-27a, miR-29a, 92a miR-, miR-100 και του miR-378) για περαιτέρω έρευνα. Αυτά τα miRNAs έχουν υψηλή ένταση σήματος και μεταγράφονται μόνα τους ή σε ένα μεγαλύτερο σιστρόνιο μαζί με άλλα miRNAs (cluster). (42)



### 8.3 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΚΟΛΠΟΥ

**Σ**τις μέχρι τώρα δημοσιεύσεις δεν έχει αναφερθεί ο ρόλος των microRNAs στη θεραπεία για το καρκίνο του κόλπου. Ο καρκίνος του κόλπου που προέρχεται από τον HPV αντιμετωπίζεται όπως και ο καρκίνος του τραχήλου με βάση τα microRNAs. Παρακάτω παραθέτουμε τις κλασικές μεθόδους αντιμετώπισης του καρκίνου του τραχήλου χωρίς τη συμβολή των microRNAs.

## Σταδιοποίηση –Θεραπεία

Μόλις διαγνωστεί καρκίνος του κόλπου, θα ληφθούν μέτρα για να προσδιοριστεί η έκταση του καρκίνου - μια διαδικασία που ονομάζεται σταδιοποίηση. Το στάδιο του καρκίνου βοηθάει να αποφασιστεί ποια θεραπεία είναι κατάλληλη. Για τον προσδιορισμό του σταδίου του καρκίνου, ο γιατρός μπορεί να χρησιμοποιήσει:

- Οι εξετάσεις απεικόνισης. Οι εξετάσεις απεικόνισης μπορεί να περιλαμβάνουν ακτινογραφίες, αξονική τομογραφία (CT), μαγνητική τομογραφία (MRI) και την τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET).



- Tiny κάμερες για να δει μέσα στο σώμα. Διαδικασία όπου χρησιμοποιούν μικροσκοπικές κάμερες για να δει μέσα στο σώμα ώστε καθοριστεί εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί μέσα κύστη (κυστεοσκόπηση) και στο ορθό (proctoscopy).

Μόλις καθοριστεί η έκταση του καρκίνου, αντιστοιχίζεται σε ένα στάδιο. Τα στάδια του καρκίνου του κόλπου είναι οι εξής:

- Στάδιο I. Ο καρκίνος περιορίζεται στο κολπικό τοίχωμα.
- Στάδιο II. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε ιστούς δίπλα στον κόλπο.
- Stage III. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί περαιτέρω στη λεκάνη.
- IVA Στάδιο. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε κοντινές περιοχές, όπως της ουροδόχου κύστης ή του ορθού.
- Στάδιο IVB. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε περιοχές μακριά από τον κόλπο, όπως το συκώτι.

## 8.4 Κλασικές θεραπείες και φάρμακα

**Ο**ι θεραπευτικές επιλογές για τον καρκίνο του κόλπου εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του τύπου του καρκίνου του κόλπου και του σταδίου. Η θεραπεία για τον καρκίνο του κόλπου συνήθως περιλαμβάνει χειρουργική επέμβαση και ακτινοβολία.

### Χειρουργική

ΟΙ τύποι της χειρουργικής επέμβασης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε γυναίκες με καρκίνο του κόλπου περιλαμβάνουν:

- Απομάκρυνση των μικρών όγκων ή των βλαβών. Ο καρκίνος περιορίζεται στην επιφάνεια του κόλπου, μαζί με ένα μικρό περιθώριο περιβάλλοντα υγιή ιστό για να εξασφαλιστεί ότι όλα τα κύτταρα καρκίνου έχουν αφαιρεθεί.
- Απομάκρυνση του κόλπου (vaginectomy). Αφαίρεση μέρος του κόλπου (μερική vaginectomy) ή ολόκληρο τον κόλπο (ριζική vaginectomy) μπορεί να χρειαστεί για να αφαιρεθεί όλος ο καρκίνος. Ανάλογα με την έκταση του καρκίνου, μπορεί να χρειαστεί χειρουργική επέμβαση για να αφαιρεθεί η μήτρα και οι ωοθήκες (υστερεκτομή) και κοντινοί λεμφαδένες (λεμφαδενεκτομή).
- Απομάκρυνση της πλειοψηφίας των οργάνων της πυέλου (πυελική exenteration). Αυτή η εκτεταμένη χειρουργική επέμβαση μπορεί να είναι μια επιλογή εάν ο καρκίνος

έχει εξαπλωθεί σε όλη την πυελική περιοχή ή αν ο καρκίνος του κόλπου έχει υποτροπιάσει.

### Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται με υψηλής ισχύος ακτίνες ενέργειας, όπως είναι ακτίνες X, για να σκοτώσουν τα καρκινικά κύτταρα. Ακτινοβολία μπορεί να παραδοθεί με δύο τρόπους:

- Εξωτερικές ακτινοβολίες. Εξωτερική ακτινοβολία κατευθύνεται σε όλη τη κοιλιακή περιοχή, ανάλογα πάντα με την έκταση του καρκίνου. Οι περισσότερες γυναίκες με καρκίνο του κόλπου λαμβάνουν εξωτερική ακτινοβολία.
- Εσωτερική ακτινοβολία κατά την εσωτερική ακτινοβολία (βραχυθεραπεία), ραδιενεργή συσκευή. Οι γυναίκες με πολύ πρώιμου σταδίου καρκίνο του κόλπου μπορεί να λάβουν μόνο εσωτερική ακτινοβολία. Άλλες γυναίκες μπορούν να λάβουν εσωτερική ακτινοβολία και μετά να υποβάλλονται και σε εξωτερική ακτινοβολία.

Η ακτινοθεραπεία σκοτώνει γρήγορα τα καρκινικά κύτταρα, αλλά μπορεί επίσης να βλάψει και κοντινά υγιή κύτταρα, προκαλώντας παρενέργειες. Οι παρενέργειες της ακτινοβολίας εξαρτώνται από την ένταση της ακτινοβολίας και πού στοχεύουν.

### Άλλες επιλογές

Εάν η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοβολία δεν μπορεί να ελέγξει τον καρκίνο σας, μπορεί να προσφερθούν άλλες θεραπείες, όπως οι εξής:

- Χημειοθεραπεία. Χημειοθεραπεία χρησιμοποιεί χημικές ουσίες για να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα. Δεν είναι σαφές κατά πόσο η χημειοθεραπεία είναι χρήσιμο σε γυναίκες με καρκίνο του κόλπου. Για το λόγο αυτό, η χημειοθεραπεία συνήθως δεν χρησιμοποιείται μόνη της για τη θεραπεία του καρκίνου του κόλπου. Η χημειοθεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια της θεραπείας με ακτινοβολία για να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας.
- Κλινικές δοκιμές. Οι κλινικές δοκιμές είναι τα πειράματα για τη δοκιμή νέων μεθόδων θεραπείας.

## **VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη παραπάνω Διπλωματική εργασία αναλύθηκε τι είναι τα microRNA και ποιος ο ρόλος τους. Επίσης αναπτύχθηκαν τα είδη των γυναικολογικών καρκίνων και συγκεκριμένα τα είδη των microRNA σε κάθε είδος καρκίνου. Πως η έκφρασή τους βοηθάει στην αξιολόγηση του καρκίνου καθώς και την επιλογή του είδους της θεραπείας και παρακολούθησή της.

Αναλυτικά, τα microRNAs (miRNAs) έχουν μήκος 21–23 νουκλεοτίδια και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω πρόσδεσης σε μια μη κωδική περιοχή των miRNA στόχων που ονομάζεται 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR). Με αυτόν το μηχανισμό, τα miRNAs ρυθμίζουν την αυτοανάνεωση, τη διαφοροποίηση και τη διαίρεση των κυττάρων, μέσω της μετα-μεταγραφικής σίγησης των γονιδίων. Διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των βλαστοκυττάρων, καθώς και σε διάφορες νόσους (με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τον καρκίνο). Τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είτε αναστέλλοντας τη μετάφραση, είτε προωθώντας την αποδόμηση συγκεκριμένων μεταγράφων RNAs (mRNAs).

Μελετήθηκε η έκφραση των microRNAs στον ορό γυναικών με επιθηλιακούς και πλακώδεις γυναικολογικούς καρκίνους.

Στους επιθηλιακούς καρκίνους κατατάσσονται :

- ο καρκίνος των ωοθηκών
- ο καρκίνος της μήτρας – ενδομητρίου
- ο καρκίνος του αιδοίου

Στους μη επιθηλιακούς καρκίνους (από πλακώδες επιθήλιο) κατατάσσονται :

- ο καρκίνος του κόλπου
- ο καρκίνος του τραχήλου
- ο καρκίνος των ωοθηκών (σπανιότερα)

Σχετικά με τους παραπάνω καρκίνους, βρέθηκαν ότι ο καρκίνος του κόλπου και του αιδοίου οφείλονται σε μεγάλο ποσοστό στον ιό HPV που ανιχνεύεται συνήθως στο καρκίνο του τραχήλου. Οπότε και η θεραπεία τους θα είναι ίδια με αυτή του καρκίνου του τραχήλου και το πώς τα miRNAs επιδρούν στον ιό HPV.

Διαπιστώθηκε ότι στη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών, οι γυναίκες με χαμηλά επίπεδα του miR-200c δεν ανταποκρίνονταν στην αγωγή με πακλιταξέλη-καρβοπλατίνη. Ενώ όταν είχαν αυξημένη έκφραση του miR-200c ανταποκρίνονταν στη παραπάνω αγωγή έχοντας χαμηλά ποσοστά υποτροπής και εξέλιξης των όγκων. Μια

άλλη μελέτη έδειξε ότι η υπερέκφραση του miR-200C καταπιέζεται από την έκφραση της β-τουμπουλίνης (TUBB3) στο στάδιο III, ένας παράγοντας που σχετίζεται με αντίσταση στο φάρμακο και τη πτωχή πρόγνωση στον καρκίνο των ωοθηκών, και αυξάνει την ευαισθησία σε πακλιταξέλη και σισπλατίνη. Από την άλλη, το miR-182 και miR-125b απέδειξαν ότι έχουν αντοχή στη σισπλατίνη. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η έκφραση των miR-200c, miR-182 και miR-125b είναι σημαντική για την αγωγή στην οποία θα καταλήξουν και στη παρούσα φάση έχει προσαρμοστεί ως η τυπική θεραπεία για γυναίκες με προχωρημένο επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών (EOC) η συνδυασμένη θεραπεία της καρβοπλατίνης / πακλιταξέλης.

Σχετικά με το καρκίνο της μήτρας – ενδομητρίου, ανακαλύφθηκε μια σειρά από miRNAs που έχουν αυξημένη έκφραση και συμμετέχουν στην ογκογένεση, σε εισβολή και μετάσταση. Η έκφραση αυτών των miRNA μπορεί να χρησιμεύσει ως προγνωστικός δείκτης, δεδομένου ότι η πρόγνωση του καρκίνου συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης των πολυάριθμων miRNAs. Οι επιστήμονες θεωρούν ότι το miR-125b, μελλοντικά θα είναι χρήσιμο ως βιοδείκτης στη θεραπεία για τον καρκίνο του ενδομητρίου.

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποδείχτηκε ότι σχετίζεται σε μεγάλο ποσοστό με το ιό HPV. Ανακαλύφθηκαν μια σειρά miRNAs όπου η έκφραση τους μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει την ευαισθησία στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Αντικαρκινική θεραπεία μπορεί να επιτευχθεί με τη ρύθμιση του επιπέδου έκφρασης των miRNAs. Αυτό θα μπορούσε να περιλαμβάνει την αναστολή της λειτουργίας των miRNAs (oncomiRs) που υπερεκφράζονται στο καρκίνο με χορήγηση συμπληρωματικών αλληλουχιών νουκλεϊνικού οξέος ή μειώνοντας το πραγματικό επίπεδο έκφρασης τους. Στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, η σισπλατίνη μπορεί να είναι το φάρμακο επιλογής σε περιπτώσεις όπου η έκφραση miRNA παράγει όγκους που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην cisplatin ή paclitaxel. Μια λεπτομερής κατανόηση των μηχανισμών των miRNA μπορούν επίσης να επιτρέψουν στοχευμένες θεραπευτικές στρατηγικές που βασίζονται στην αναστολή ή συμπλήρωση των miRNA. Εάν η υπερέκφραση ενός συγκεκριμένου miRNA προκαλεί αντίσταση στη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία, η αντίσταση μπορεί να μειωθεί με την αναστολή της λειτουργίας των miRNA. Ομοίως, εάν η μειωμένη ρύθμιση ενός miRNA προκαλεί αντίσταση, αυτό μπορεί να βελτιωθεί με την συμπλήρωση αυτού του miRNA. Ως εκ τούτου, μπορεί να αναπτυχθεί νέα θεραπεία με το συνδυασμό αναστολέων ή συμπληρωμάτων miRNA με χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία.

## **VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **N., Βρεττός.** ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ miR-13. 2004.
2. **A, Μπούτα.** Ανάλυση μικρών μορίων RNA που ελέγχουν μετα-μεταγραφικά φαινόμενα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. 2004, σελ.33-36.
3. **E. Σκούρτη, I. Χριστοδούλου, Σ. Λογοθέτη, Β. Ζουμπουρλής.** MicroRNAs, καρκίνος και καρκινικά βλαστοκύτταρα. Από την έρευνα στη θεραπεία. 2013, 30(4):391-405.
4. *Abnormal vaginal bleeding in pre-, peri and post-menopausal women. A diagnostic guide for general practitioners and gynaecologists.* s.l. : Cancer Australia, 2011.
5. **Centre, National Breast and Ovarian Cancer.** *National Breast and Ovarian Cancer Centre. Epithelial ovarian cancer. Understanding your diagnosis and treatment.* Australia : National Breast and Ovarian Cancer Centre.Cancer Australia , 2012 .
6. **Croce, Gianpiero Di Leva and Carlo M.** The Role of microRNAs in the Tumorigenesis of Ovarian Cancer. *Front Oncol.* . 2013, 3:153.
7. **Wu X, Zhi X, Liu M, Xie J, Zhao S.** Elevated levels of dendritic cell-correlated miRNAs in ascites and sera of patients with ovarian cancer. *Chinese journal of cellular and molecular immunology.* 2015, 31(3):383-6, σσ. 31(3):383-6.
8. **Häusler SF, Keller A, Chandran PA, Ziegler K, Zipp K, Heuer S, Krockenberger M, Engel JB, Hönig A, Scheffler M, Dietl J, Wischhusen J.** Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *Br J Cancer.* 2010 , 103(5):693-700.
9. **Taylor DD, Gercel-Taylor C.** MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008, 110(1):13-21.
10. **Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE.** The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol.* . 2009 , 112(1):55-9.
11. **Xu YZ, Xi QH, Ge WL, Zhang XQ.** Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013, 14(2):1057-60.
12. **Guo F, Tian J, Lin Y, Jin Y, Wang L, Cui M.** Serum microRNA-92 expression in patients with ovarian epithelial carcinoma. *J Int Med Res.* 2013, 41(5):1456-61.
13. **Zheng H, Zhang L, Zhao Y, Yang D, Song F, Wen Y, Hao Q, Hu Z, Zhang W, Chen K.** Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *PLoS One.* . 2013, 1;8(11):e77853.
14. **Chung YW, Bae HS, Song JY, Lee JK, Lee NW, Kim T, Lee KW.** Detection of microRNA as novel biomarkers of epithelial ovarian cancer from the serum of ovarian cancer patients. *Int J Gynecol Cancer.* 2013, (4):673-9.
15. **Ji T, Zheng ZG, Wang FM, Xu LJ, Li LF, Cheng QH, Guo JF, Ding XF.** Differential microRNA expression by Solexa sequencing in the sera of ovarian cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* . 2014, (4):1739-43.
16. **I Shapira, M Oswald, J Lovecchio, H Khalili, A Menzin, J Whyte, L Dos Santos, S Liang, T Bhuiya, M Keogh, C Mason, K Sultan, D Budman, P K Gregersen and A T Lee.** Circulating biomarkers for detection of ovarian cancer and predicting cancer outcomes. *British Journal of Cancer.* 2013, 110: 976–983.

17. **Kan CW, Hahn MA, Gard GB, Maidens J, Huh JY, Marsh DJ, Howell VM.** Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2012, 12:627.
18. **Záveský L, Jandáková E, Turyna R, Langmeierová L, Weinberger V, Záveská Drábková L, Hůlková M, Hořínek A, Dušková D, Feyereisl J, Minář L, Kohoutová M.** Evaluation of Cell-Free Urine microRNAs Expression for the Use in Diagnosis of Ovarian and Endometrial Cancers. A Pilot Study. *Pathol Oncol Res*. 2015, 21(4):1027-35.
19. **Megumi Yanokura, Kouji Banno\*, Miho Iida, Haruko Irie, Kiyoko Umene, Kenta Masuda, Yusuke Kobayashi, Eiichiro Tominaga, Daisuke Aoki.** MicroRNAs IN ENDOMETRIAL CANCER: RECENT ADVANCES AND POTENTIAL CLINICAL APPLICATIONS. *EXCLI Journal*. 2015, 14:190-198.
20. **Pan Q, Chegini N.** MicroRNA signature and regulatory functions in the endometrium during normal and disease states. *Semin Reprod Med*. 2008, (6):479-93.
21. **Boren T, Xiong Y, Hakam A, Wenham R, Apte S, Wei Z, Kamath S, Chen DT, Dressman H, Lancaster JM.** MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2008, (2):206-15.
22. **Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X.** Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev*. 2009, (1):50-5.
23. **Chung TK, Cheung TH, Huen NY, Wong KW, Lo KW, Yim SF, Siu NS, Wong YM, Tsang PT, Pang MW, Yu MY, To KF, Mok SC, Wang VW, Li C, Cheung AY, Doran G, Birrer MJ, Smith DI, Wong YF.** Dysregulated microRNAs and their predicted targets associated with endometrioid endometrial adenocarcinoma in Hong Kong women. *Int J Cancer*. 2009, 124(6):1358-65.
24. **Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, Christian M, Ho KK, Fusi L, Dina RE, Brosens JJ, Ghaem-Maghani S, Lam EW.** Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res*. 2010, 70(1):367-77.
25. **Hiroki E, Akahira J, Suzuki F, Nagase S, Ito K, Suzuki T, Sasano H, Yaegashi N.** Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer Sci*. 2010, 101(1):241-9.
26. **Anna Torres, Kamil Torres, Anna Pesci, Marcello Ceccaroni, Tomasz Paszkowski, Paola Cassandrini, Giuseppe Zamboni, Ryszard Maciejewski.** Deregulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer*. 2012, 12:369.
27. **Torres A, Torres K, Pesci A, Ceccaroni M, Paszkowski T, Cassandrini P, Zamboni G, Maciejewski R.** Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2013, 132(7):1633-45.
28. **Jia W, Wu Y, Zhang Q, Gao G, Zhang C, Xiang Y.** Identification of four serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential non-invasive biomarkers for endometrioid endometrial cancer. *Oncol Lett*. 2013, 6(1):261-267.
29. **Záveský L, Jandáková E, Turyna R, Langmeierová L, Weinberger V, Záveská Drábková L, Hůlková M, Hořínek A, Dušková D, Feyereisl J, Minář L, Kohoutová M.** Evaluation of Cell-Free Urine microRNAs Expression for the Use in Diagnosis of Ovarian and Endometrial Cancers. A Pilot Study. *Pathol Oncol Res*. 2015, 21(4):1027-35.
30. **Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T.** Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*. 2005, 96(2):111-5.



31. **Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T.** Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006, 130(7):2113-29.
32. **Yang N, Kaur S, Volinia S, Greshock J, Lassus H, Hasegawa K, Liang S, Leminen A, Deng S, Smith L, Johnstone CN, Chen XM, Liu CG, Huang Q, Katsaros D, Calin GA, Weber BL, Bützow R, Croce CM, Coukos G, Zhang L.** MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* . 2008, 68(24):10307-14.
33. **Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL.** Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. . *Br J Haematol.* . 2008, 141(5):672-5.
34. **Patrick S. Mitchell, Rachael K. Parkin, Evan M. Kroh, Brian R. Fritz, Stacia K. Wyman, Era L. Pogossova-Agadjanyan, Amelia Peterson, Jennifer Noteboom, Kathy C. O'Briant, April Allen, Daniel W. Lin, Nicole Urban, Charles W. Drescher.** Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* . 2008, 105(30): 10513–10518.
35. **Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K, Kuroda M.** Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One*. 2009, 4(5):e5532.
36. **Beatriz de Melo Maia, André Mourão Lavorato-Rocha, Lara Sant'Ana Rodrigues, Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo, Glauco Baiocchi, Monica Maria Stiepcich, Renato Puga, Leandro de A. Lima, Fernando Augusto Soares, Rafael Malagoli Rocha.** microRNA Portraits in Human Vulvar Carcinoma. *Cancer Prev Res.* . 2013, 6; 1231.
37. **Kouji Banno, Miho Iida, Megumi Yanokura, Iori Kisu, Takashi Iwata, Eiichiro Tominaga, Kyoko Tanaka, and Daisuke Aoki.** MicroRNA in Cervical Cancer: OncomiRs and Tumor Suppressor miRs in Diagnosis and Treatment. *The Scientific World Journal*. 2014.
38. **Pedroza-Torres A, López-Urrutia E, García-Castillo V, Jacobo-Herrera N, Herrera LA, Peralta-Zaragoza O, López-Camarillo C, De Leon DC, Fernández-Retana J, Cerna-Cortés JF, Pérez-Plasencia C.** MicroRNAs in cervical cancer: evidences for a miRNA profile deregulated by HPV and its impact on radio-resistance. *Molecules.* . 2014, 19(5):6263-81.
39. **Yu J, Wang Y, Dong R, Huang X, Ding S, Qiu H.** Circulating microRNA-218 was reduced in cervical cancer and correlated with tumor invasion. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012, 138(4):671-4.
40. **Chen J, Yao D, Li Y, Chen H, He C, Ding N, Lu Y, Ou T, Zhao S, Li L, Long F.** Serum microRNA expression levels can predict lymph node metastasis in patients with early-stage cervical squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*. 2013, 32(3):557-67.
41. **Zhao S, Yao D, Chen J, Ding N.** Circulating miRNA-20a and miRNA-203 for screening lymph node metastasis in early stage cervical cancer. *Genet Test Mol Biomarkers.* . 2013, 17(8):631-6.
42. **Wang X, Wang HK, Li Y, Hafner M, Banerjee NS, Tang S, Briskin D, Meyers C, Chow LT, Xie X, Tuschl T, Zheng ZM.** microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014, 111(11):4262-7.